

**Variabilität der Transgen-Expression in
Arabidopsis thaliana und *Nicotiana tabacum*:
Ein Beitrag zur Klärung der Ursachen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Berthold Lechtenberg

aus Coesfeld in Westfalen

Köln 2002

Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Renate Schmidt

Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung:

29. November 2002

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Expression von Transgenen in Pflanzen	1
1.2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing (RNA-Silencing)	3
1.3 Transkriptionelles Gen-Silencing (TGS)	8
1.4 Das gewählte Untersuchungssystem	9
1.5 Zielsetzung	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Chemikalien und Enzyme	13
2.2 Medien	14
2.2.1 Medien für <i>E. coli</i>	14
2.2.2 Medien für <i>A. tumefaciens</i>	14
2.2.3 Medien für die axenische Kultur von <i>A. thaliana</i>	14
2.2.4 Medien für die Transformation und Anzucht von <i>N. tabacum</i>	14
2.3 Antibiotika Konzentrationen	15
2.4 Oligonukleotide	15
2.5 Biologisches Material	16
2.5.1 Pflanzen	16
2.5.2 Bakterienstämme	16
2.5.3 Vektoren	17
2.5.4 Verwendete T-DNA-Konstrukte	17
2.5.5 Klonierung der verwendeten T-DNA-Konstrukte	18

II

2.6	Methoden	19
2.6.1	Gängige Labortechniken	19
2.6.2	Wachstumsbedingungen der Pflanzen	19
2.6.3	Oberflächensterilisation von Samen	20
2.6.4	Agrobakterien-vermittelte Blattstückchentransformation von <i>N. tabacum</i>	20
2.6.5	Nomenklatur der Pflanzen	21
2.6.6	Präparation genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> und <i>N. tabacum</i>	21
2.6.7	DNA Transfer auf Nylonmembranen („Southern Blot“) und Hybridisierung der Membranen	22
2.6.8	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	22
2.6.9	Präparation von RNA aus <i>A. thaliana</i>	23
2.6.10	RNA Transfer auf Nylonmembranen („Northern Blot“) und Hybridisierung der Membranen	23
2.6.11	β -Glucuronidase-Aktivitätstests	25
2.6.12	Ermittlung der GFP-Fluoreszenz	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Etablierung transgener <i>A. thaliana</i> und <i>N. tabacum</i> Einzelkopielinien	27
3.2	Gleichzeitige Expression unterschiedlicher Transgene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in <i>A. thaliana</i>	32
3.2.1	Gleichzeitige, stabile und koordinierte Expression von GUS-, SPT- und GFP-Reportergenen, die sich in Tandem auf einer T-DNA befinden	32
3.2.2	Vergleich der steady state mRNA-Mengen des SPT- und GUS-Gens	39
3.3	Expression des GUS-Reportergens unter Kontrolle des pnos-Promotors in <i>A. thaliana</i>	40
3.3.1	Variabilität in der Expression des GUS-Reportergens zwischen unabhängigen <i>A. thaliana</i> pg-Linien	40
3.4	Inaktivierung der Reporter gene in <i>A. thaliana</i>	42
3.4.1	Inaktivierung der Reporter gene in <i>A. thaliana</i> Linien, die drei oder mehr GUS-Reporter gene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors tragen	42

3.4.2	Fehlende Korrelation zwischen der steady state mRNA-Menge des GUS-Reportergens und der Proteinaktivität der β -Glucuronidase in Linien, die von Inaktivierung des GUS-Gens betroffen sind	48
3.4.3	Expression der Reportergene in Kreuzungsnachkommen, die zusätzlich eine <i>antisense</i> Kopie des GUS-Reportergens exprimieren	50
3.4.4	Expression und Silencing der Reportergene in invertierten Sequenzwiederholungen	55
3.4.5	Vereinzelttes Auftreten einer Inaktivierung der Reportergene in <i>A. thaliana</i> Einzelkopielinien, die lediglich je zwei Kopien der Reportergene tragen	58
3.5	Expression des GUS-Reportergens in <i>N. tabacum</i>	59
3.6	Expression der Reportergene in <i>A. thaliana</i> T-DNA-Populationen	63
3.6.1	Expression des GUS-Reportergens in Linien einer <i>A. thaliana</i> Population, die eine Dg-T-DNA tragen	63
3.6.2	Expression des GFP-Reportergens in transgenen <i>A. thaliana</i> Linien	75
4	DISKUSSION	80
4.1	Die Expression von Transgenen in <i>A. thaliana</i>	80
4.1.1	Gleichzeitige stabile und koordinierte Expression dreier unterschiedlicher Transgene in <i>A. thaliana</i>	80
4.1.2	Einflüsse auf die Expression von Transgenen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in <i>A. thaliana</i>	82
4.1.3	Der Einfluss des Integrationsortes auf die Expression von Transgenen	83
4.2	Die Inaktivierung von Transgenen in <i>A. thaliana</i>	85
4.2.1	Evidenzen für einen transkriptionellen Schwellenwert als Auslöser von RNA-Silencing	85
4.2.2	Untranslatierbare mRNA in Linien, die Silencing des GUS-Gens zeigen	86
4.2.3	Übertragung des Silencings	86
4.2.4	<i>Antisense</i> vermittelte Inaktivierung der Reportergene	90
4.2.5	Der Einfluss von Sequenzwiederholungen auf die Expression des GUS-Gens	93

IV		
4.3	Expression des GUS-Gens in <i>N. tabacum</i>	95
4.4	RNA-Silencing als Hauptursache der Variabilität der Transgenexpression in T-DNA-transformierten <i>A. thaliana</i> Populationen	96
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	ABSTRACT	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	103
	ERKLÄRUNG	116
	LEBENS LAUF	117
	DANK	118

Abkürzungsverzeichnis

CaMV 35S-Promotor	35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzyladenin
b, kb, Mb	Basen, Kilobasen, Megabasen
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
Ci	Curie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUS	β -Glucuronidase
hemiz.	für die T-DNA hemizygot
homoz.	für die T-DNA homozygot
HPT	Hygromycinphosphotransferase
iPCR	inverse Polymeraskettenreaktion
IR(s)	invertierte Sequenzwiederholung(en)
LB	Linke Grenze der T-DNA („Left Border“)
MDL	Max-Delbrück-Laboratorium
min	Minute
Mops	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPG	Max-Planck-Gesellschaft
MPIMP	Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie
MS-Medium	Murashige & Skoog Medium
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronsäure Trihydrat
NPT	Neomycinphosphotransferase
nt	Nukleotide
OCS	Octopinsynthasegen
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PC	Phenol-Chloroform im Verhältnis 25:24
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pnos	Nopalinsynthase-Promotor
PTGS	posttranskriptionelles Gen-Silencing
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RB	Rechte Grenze der T-DNA („Right Border“)
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RIP	<i>repeat induced point mutation</i>
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
siRNAs	<i>small interfering RNAs</i> , kleine interferierende RNAs
SPT	Streptomycinphosphotransferase
TGS	transkriptionelles Gen-Silencing
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure

1 Einleitung

1.1 Die Expression von Transgenen in Pflanzen

Seit mehr als einer Dekade ist die Expression von Transgenen in Pflanzen unverzichtbarer und routinemäßiger Bestandteil molekularbiologischer Forschung. Die ektopische Expression fremder Gene oder die Expression zusätzlicher Kopien endogener Gene, sogenannte Überexpression, helfen, wichtige biologische Fragestellungen zu beantworten. Die Expression von *antisense* Kopien endogener Gene kann die Expression dieser drastisch verringern und zu Mutanten analoge Phänotypen hervorrufen.

Auch in industriellen und landwirtschaftlichen Anwendungen gewinnen gentechnisch modifizierte Pflanzen stetig an Einfluss. Mittels Expression von Transgenen können Pflanzen zu kostengünstigen Produzenten für industriell oder medizinisch nutzbare Proteine werden (De Wilde et al. 2000, Hughes und Shanks 2002). Transgenexpression kann auch den Wert von Nutzpflanzen steigern, indem gezielt gewünschte Substanzen angereichert oder die Mengen unerwünschter Stoffe verringert werden (Welch 2002). Die Expression von Transgenen kann landwirtschaftlich wichtige Pflanzen toleranter gegen Stress wie z. B. Kälte (Warren 1998), Trockenheit (Sang et al. 2001) oder Pathogenbefall machen (Jach et al. 1995). Oft ist dazu nicht nur die Expression lediglich eines Transgens erforderlich, sondern die Expression gleich mehrerer fremder Gene. Dadurch ist das Einbringen neuer Stoffwechselwege in die Pflanze möglich.

Bei der weitverbreiteten Anwendung von Transgenen ist es umso erstaunlicher, dass über die Grundlagen ihrer Expression in Pflanzen noch zahlreiche Unklarheiten bestehen. So zeigt sich in transgenen Populationen häufig eine große Variabilität bezüglich der Expression des Transgens. In der Untersuchung einer Population unabhängiger transgener *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) Pflanzen, in die ein β -Glucuronidasegen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors eingebracht worden war, zeigten sich bis zu 1000-fache Unterschiede der gemessenen β -Glucuronidase-Aktivitäten (Holtorf *et al.* 1995).

Werden zwei oder drei verschiedene Transgene gleichzeitig in einer Pflanze exprimiert, werden oft große Unterschiede im Verhältnis der Expression beider Transgene zueinander beobachtet. In einer Analyse wurde die gleichzeitige Expression der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und der β -Glucuronidase (GUS) in transgenen *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*) Kalli untersucht (Peach und Velten 1991). Unabhängige Kalli wiesen gleichzeitig hohe Aktivität des CAT-Gens und geringe Aktivität des GUS-Gens auf, andere

Kalli demgegenüber hohe Aktivität des GUS-, aber niedrige Aktivität des CAT-Gens. Auch wurden Kalli gefunden, die für beide Gene hohe oder beide Gene niedrige Aktivität zeigten. Das Verhältnis der GUS- zu CAT-Aktivität lag zwischen 0,05 und 48,99. Koordinierte Expression von zwei oder mehr unterschiedlichen Transgenen findet sich nur selten (Gidoni *et al.* 1988). Für die beobachtete Variabilität wurden verschiedene Ursachen vorgeschlagen, so z. B. ein Einfluss der chromosomalen Umgebung auf die Expression von Transgenen. Dieser Einfluss wurde auch als „Positionseffekt“ bezeichnet (Dean *et al.* 1988b, Mol *et al.* 1990, Peach und Velten 1991). Andere Einflüsse könnten die Kopienzahl der Transgene, Rearrangements der Transgen-DNA oder Homologie-vermittelte Effekte sein (Maqbool und Christou 1999).

Die Variabilität der Transgenexpression kann bis zum weitgehenden oder völligen Verlust der Expression des Transgens reichen. Dies wird als Transgen-Silencing bezeichnet (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). Da die drastisch verringerte oder völlig unterbundene Expression nicht auf einem Verlust oder einer Veränderung der DNA-Sequenzen der betroffenen Gene beruht, handelt es sich um sogenannte epigenetische Effekte (Russo *et al.* 1996). Transgen-Silencing ist zweifellos ein großes Hindernis in der Etablierung transgener pflanzlicher Linien mit stabiler Expression des eingebrachten Gens. Zuerst beschrieben wurde Transgen-Silencing bei der Analyse transgener Tabakpflanzen. Diese trugen verschiedene Antibiotikaresistenzgene und zeigten eine negative Korrelation zwischen der Kopienzahl des Transgens und seiner Expression (Matzke *et al.* 1989). Das Einbringen eines Chalkonsynthase-Transgens (*Chs*) mit Sequenzhomologien zum endogenen *Chs*-Gen führte in Petunien nicht wie erwartet zu einer intensiveren farbigen Pigmentierung der Blüte, sondern im Gegenteil zu weißen Blütensektoren oder komplett weißen Blüten (Napoli *et al.* 1990). In diesen weißen Bereichen waren sowohl das *Chs*-Transgen als auch das endogene *Chs*-Gen von Silencing betroffen. Dieses Phänomen wurde als „Kosuppression“ bezeichnet (Napoli *et al.* 1990). Die Expression von zusätzlichen Kopien endogener Gene, die als Transgene in die Pflanze eingebracht werden, kann sowohl zu Überexpression, als auch zu Kosuppression führen (Staelin *et al.* 2001, Li und Nam 2002, Mishra *et al.* 2002).

In den folgenden Jahren wurde von Silencing verschiedenster Transgene berichtet (zusammengefasst in Flavell 1994, zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). Wurde zunächst vermutet, beim Silencing handele es sich um ein Transgen-spezifisches Phänomen, so zeigten sich im Laufe der Zeit zahlreiche Parallelen zu natürlichen

epigenetischen Mechanismen der Genregulation und der Abwehr pathogener RNA und DNA (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001).

Die Inaktivierung eines Gens durch Unterbrechung des genetischen Informationsflusses kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Wird bereits die Transkription eines Gens unterdrückt, bezeichnet man dies als transkriptionelles Gen-Silencing (TGS). TGS ist verbunden mit erhöhter Methylierung der Promotorbereiche der betroffenen Gene und ist meiotisch nicht reversibel (Assaad *et al.* 1993, Park *et al.* 1996).

Erfolgt die Inaktivierung eines Gens trotz unveränderter Transkription durch einen Abbau der resultierenden mRNA, spricht man von posttranskriptionellem Gen-Silencing (PTGS) oder RNA-Silencing. RNA-Silencing ist meiotisch reversibel und wird in jeder Generation neu etabliert. Zeitpunkt und Ausmaß dieser Etablierung sind variabel. Die Ausbreitung des RNA-Silencing erfolgt systemisch (Palauqui *et al.* 1997, Voinnet und Baulcombe 1997) und ist kein klonales Ereignis (Dehio und Schell 1994, Jorgensen *et al.* 1996).

Spezifisch für RNA-Silencing ist das Auftreten 21 bis 25 nt kleiner RNAs mit Homologie zur transkribierten Sequenz des inaktivierten Gens (Hamilton und Baulcombe 1999). Ferner trat häufig verstärkte Methylierung der transkribierten Sequenz auf (English *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997).

1.2 Posttranskriptionelles Gen-Silencing (RNA-Silencing)

Dehio und Schell (1994) konnten zeigen, dass die Inaktivierung eines *RoIB*-Transgens in *A. thaliana* durch posttranskriptionellen Abbau der *RoIB*-mRNA verursacht wurde. Da die Expression des *RoIB*-Gens einen morphologischen Phänotypen verursachte, zeigte sich bei Inaktivierung des *RoIB*-Gens eine Reversion zum Wildtyp-Phänotypen. Derartige Reversion erfolgte in jeder Generation im Laufe der Entwicklung der betroffenen Pflanzen und zeigte sich innerhalb einer Population in einer bestimmten Frequenz. Die Frequenz der Reversion variierte zwischen unabhängigen T-DNA-transformierten Linien und stieg mit erhöhter *RoIB*-Kopienzahl an.

Bei der Expression eines Chalkonsynthase-Transgens (*Chs*) in Petunie zeigte sich ebenfalls eine negative Korrelation zwischen der Kopienzahl des Transgens und dessen Expression (Jorgensen *et al.* 1996). Bei der Expression eines β -Glucuronidasegens in *N. tabacum* zeigte sich bis zu einer bestimmten Kopienzahl des GUS-Gens eine positive, darüber hinaus eine negative Korrelation zur Expression (Hobbs *et al.* 1993).

In vielen Untersuchungen wiesen Pflanzen, die das Transgen homozygot trugen, ausgeprägteres Silencing auf, als vergleichbare hemizygote Pflanzen. Zum Teil wurde Silencing nur in homozygoten Pflanzen beobachtet (Dehio und Schell 1994, Elmayan und Vaucheret 1996, English *et al.* 1996). Auch bei Kosuppression wurde in Pflanzen, die für das Transgen homozygot waren, ein ausgeprägteres Silencing des Transgens und des endogenen Gens dokumentiert (De Carvalho *et al.* 1992, Dorlhac de Borne *et al.* 1994).

Nicht nur steigende Kopienzahl des Transgens, auch die Verwendung stärkerer Promotoren, die das Transgen kontrollierten, führten zu einer größeren Anzahl an Pflanzen, die Silencing aufwiesen (Que *et al.* 1997).

Aufgrund all dieser Beobachtungen wurde das sogenannte Schwellenwert-Modell entworfen (Dehio und Schell 1994, Vaucheret *et al.* 1998). Nach dieser Hypothese wird RNA-Silencing durch Überschreiten der mRNA-Konzentration des Transgens bzw. des Transgens und des endogenen Gens über einen Schwellenwert ausgelöst. Andere Untersuchungen bestätigen dies und legen zudem nahe, dass dieser Schwellenwert genspezifisch ist (Schubert 2002).

Die Tatsache, dass auch promotorlose Transgene RNA-Silencing bzw. Kosuppression auslösen können (van Blokland *et al.* 1994, Voinnet *et al.* 1998), lässt vermuten, dass das Schwellenwert-Modell keine allgemeingültige Erklärung für RNA-Silencing geben kann. Alternativ bzw. ergänzend zum Schwellenwert-Modell wurde vorgeschlagen, dass die Produktion von aberranter Transgen-mRNA Silencing initiieren könnte. Ursache für die aberranten Transkripte könnte die häufig bei Transgen-Silencing beobachtete Methylierung der transkribierten Sequenz des inaktivierten Transgens, die exzessive Produktion von mRNA oder die Transkription von außergewöhnlichen DNA-Strukturen sein (zusammengefasst in Baulcombe 1996).

Für den Mechanismus des RNA-Silencing wurde bereits in frühen Analysen die Beteiligung einer RNA abhängigen RNA Polymerase (RdRP) vorgeschlagen. Von der RdRP, anhand der von Silencing betroffenen mRNA, synthetisierte kleine, in *antisense* Orientierung vorliegende RNAs, könnten posttranskriptionellen Abbau der betroffenen mRNA durch doppelstrangspezifische RNAsen (dsRNAsen) herbeiführen (Dougherty und Parks 1995). In *Lycopersicon esculentum* wurde das Gen einer RdRP kloniert und die Aktivität des entsprechenden Proteins nachgewiesen werden (Schiebel *et al.* 1998). Mittels einer in *A. thaliana* isolierten RdRP-Mutante wurde die Beteiligung einer RdRP an Transgen-Silencing bestätigt (Dalmay *et al.* 2000, Mourrain *et al.* 2000).

Aus Pflanzen mit posttranskriptionell inaktivierten Genen konnten 21 bis 25 nt kurze RNAs, sogenannte „small interfering RNAs“ (siRNAs), isoliert werden. Sie lagen sowohl in *sense* als auch in *antisense* Orientierung vor und waren spezifisch für die transkribierte Sequenz der Gene, deren mRNA durch RNA-Silencing reduziert war (Hamilton und Baulcombe 1999).

Andere Organismen zeigen Mechanismen, die dem RNA-Silencing in Pflanzen sehr ähnlich sind. Die Injektion von dsRNA führt in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) zur sogenannten RNA-Interferenz (RNAi). RNAi führt zum Abbau aller transkribierten Sequenzen, die zur injizierten dsRNA homolog sind. Auch bei RNAi werden siRNAs gefunden (zusammengefasst in Zamore 2001). Für diese konnte in *C. elegans* belegt werden, dass sie nicht nur Abbauprodukt von dsRNA sind, sondern zugleich einer RdRP als „Primer“ für die erneute Synthese von *antisense* RNA und damit zur Aufrechterhaltung des Abbauprozesses dienen (Sijen *et al.* 2001). Alternativ zu einer RdRP-vermittelten Aufrechterhaltung des Abbauprozesses wurde für Pflanzen eine Paarung von mRNA-Abbauprodukten mit der intakten Transgen-mRNA vorgeschlagen. Dies würde ebenfalls zu dsRNA führen (Metzlaff *et al.* 1997).

In *D. melanogaster* wurde eine ATP-abhängige Endonuklease („*Dicer*“) charakterisiert, die in der Lage ist, injizierte dsRNAs und dazu homologe endogene mRNAs zu siRNAs abzubauen (Bernstein *et al.* 2001). Eine Mutation im orthologen Gen aus *A. thaliana* führt zu erheblichen morphologischen Defekten (*carpel factory*, Jacobsen *et al.* 1999). Studien in Pflanzen lassen vermuten, dass der Abbauprozess der von Silencing betroffenen mRNA ebenfalls unter Beteiligung von Endonukleasen stattfindet (Metzlaff *et al.* 1997, Tanzer *et al.* 1997, Han und Grierson 2002).

Invertierte Sequenzwiederholungen (IRs) zeigen besonders häufig eine Beteiligung an Gen-Silencing. Dies belegen zahlreiche Untersuchungen, bei denen invertiert zueinander vorliegende T-DNAs analysiert wurden (van Blokland *et al.* 1994, Jorgensen *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997, Hobbs *et al.* 1993). Die gezielte Expression von invertierten Sequenzwiederholungen löste sehr effizient Silencing von Transgenen und endogenen Genen aus. Eine intramolekulare Paarung der mRNA des transkribierten IRs führt zu dsRNA (Mette *et al.* 2000). Diese könnte einen zu RNAi analogen Mechanismus auslösen (Waterhouse *et al.* 1998, Chuang und Meyerowitz 2000, Mette *et al.* 2000). Alternativ zu diesem RNA-vermittelten Auslösen von Silencing durch die Transkription invertierter Sequenzwiederholungen wurde vorgeschlagen, dass auch mögliche Sekundärstrukturen der DNA, die in invertierten Sequenzwiederholungen vorliegt, Silencing auslösen. Diese

DNA-Sekundärstrukturen könnten von Proteinen erkannt werden, die am Silencing-Mechanismus beteiligt sind. Das Silencing könnte durch Paarung der betroffenen DNA-Sequenzen *in trans* auf homologe Sequenzen übertragen werden (zusammengefasst in Selker 1999). Auch endogene Gene können als invertierte Sequenzwiederholungen Silencing auslösen. Dies konnte durch die Untersuchung der Gene für die Phosphoribosylanthranilat-Isomerase (PAI) in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Invertierte, im Ökotyp Wassilewskija vorliegende PAI-Kopien hatten einen Einfluss *in trans* auf die Methylierung und die Expression homologer PAI-Sequenzen, die an ungekoppelten Loci vorlagen (Bender und Fink 1995, Luff *et al.* 1999).

Die Transkription von Gensequenzen in *antisense* Orientierung kann ebenfalls zu einer Inaktivierung der entsprechenden *sense* Gensequenzen führen (zusammengefasst in Mol *et al.* 1990). Durch entsprechende *antisense* Transkripte können sowohl in die Pflanze eingebrachte Transgene (Ecker und Davis 1986), als auch endogene Gene inaktiviert werden (van der Krol *et al.* 1988). Die Inaktivierung des *Chs*-Gens in Petunie durch Einführen eines *antisense* Konstruktes dieses Gens erzeugte Phänotypen der Blüten, die denen, die durch Kosuppression erzeugt wurden, ähnlich waren (van der Krol *et al.* 1988, Napoli *et al.* 1990, Jorgensen *et al.* 1996). Allerdings zeigten nicht alle Pflanzen, die ein *Chs*-Gen in *antisense* Orientierung exprimierten, durch den Verlust der farbigen Pigmentierung der Blüte eine Inaktivierung des endogenen *Chs* Gens (van der Krol *et al.* 1990a). Der Verlust der Pigmentierung korrelierte mit den steady state mRNA-Mengen des *antisense Chs*-Gens. In einigen Untersuchungen konnte durch die Expression von Gensequenzen in *antisense* Orientierung überhaupt keine Inaktivierung der entsprechenden *sense* Gensequenzen erzielt werden (Delauney *et al.* 1988). Als Ursache wurde in diesen Fällen die Instabilität des *antisense* Transkripts vermutet. Da auch bei *antisense*-vermitteltem Silencing siRNAs nachgewiesen wurden, legt einen dem RNA-Silencing vergleichbaren Mechanismus nahe (Di Serio *et al.* 2001).

RNA-Silencing ist nicht zellautonom, sondern breitet sich systemisch in der Pflanze aus, wie durch Analysen an Tabak belegt wurde (Palauqui *et al.* 1997, Voinnet und Baulcombe 1997). Der Transport des sequenzspezifischen Signals innerhalb der Pflanze erfolgt sowohl von Zelle zu Zelle über Plasmodesmata als auch über längere Distanzen innerhalb des Phloems (Palauqui *et al.* 1997, Voinnet *et al.* 1998). Das Signalmolekül konnte bisher nicht identifiziert werden. Aufgrund der Sequenzspezifität des Signals wird eine RNA-Komponente, möglicherweise in einem Ribonukleoproteinkomplex, vermutet (zusammengefasst in Mlotshwa *et al.* 2002). Diese Vermutung wird von Untersuchungen

gestützt, die belegten, dass systemisch über das Phloem transportierte mRNA phänotypische Veränderungen in sich entwickelnden Geweben verursachen kann (Kim *et al.* 2001).

Auch RNA-Viren können sich innerhalb der Pflanze systemisch ausbreiten (zusammengefasst in Ueki und Citovsky 2001). In der Abwehr derartiger pathogener Elemente liegt eine der möglichen natürlichen Funktionen von RNA-Silencing (zusammengefasst in Waterhouse *et al.* 2001). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass von RNA-Viren befallene Pflanzen nach einer Phase der Sensitivität Resistenz gegen diese Viren erlangen (Ratcliff *et al.* 1997, Al-Kaff *et al.* 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Transgene, die dem RNA-Silencing unterliegen, durch Übertragung des Silencings Resistenz gegen RNA-Viren verleihen können (English *et al.* 1996, zusammengefasst in Baulcombe 1996). Voraussetzung für die Übertragung von Silencing ist Homologie zwischen transkribierten Sequenzen des Transgens und des Virusgenoms. Umgekehrt kann RNA-Silencing eines Transgens auch durch die Infektion mit einem RNA-Virus ausgelöst werden, das homologe Sequenzen zur transkribierten Sequenz des Transgens aufweist (Al-Kaff *et al.* 1998, Ruiz *et al.* 1998). Hierbei reichen bereits identische Fragmente von 23 Nukleotiden Länge für erfolgreiches Silencing von Transgenen aus (Thomas *et al.* 2001). Dieses Phänomen wird auch als „Virus-induziertes Gen-Silencing“ (VIGS) bezeichnet und ist häufig mit dem Auftreten von siRNAs von Virus- und Transgen-Sequenzen (Hamilton und Baulcombe 1999) und mit DNA-Methylierung des Transgens verbunden (Jones *et al.* 1998, 1999). Möglicherweise aktiviert die während der Replikation des Virusgenoms vorliegende dsRNA RNA-Silencing. Da sich VIGS nur gegen Exons homologer Sequenzen richtet, wird vermutet, dass die Degradierung der mRNA beim RNA-Silencing im Cytoplasma erfolgt (Ruiz *et al.* 1998).

Pflanzenviren haben verschiedene Strategien entwickelt, um RNA-Silencing zu unterdrücken. Eine Klasse von Proteinen unterdrückt die Initiation von RNA-Silencing (z. B. 2b aus dem Gurkenmosaikvirus; Brigneti *et al.* 1998), eine weitere hemmt die Ausbreitung des systemischen Silencing-Signals (p25 aus dem Kartoffelvirus X; Voinnet *et al.* 2000) und eine dritte kann RNA-Silencing revertieren und die Akkumulation von siRNAs verhindern (u.a. HC-Pro aus Potyviren; Mallory *et al.* 2001). Dies belegt erneut die mögliche Rolle von RNA-Silencing zur Abwehr pflanzenpathogener Viren.

Darüber hinaus führt RNA-Silencing zur Unterdrückung der Transposition mobiler genetischer Elemente. Eine Mutation in einem Gen einer für RNA-Silencing essentiellen RNA-Helikase aus *Chlamydomonas reinhardtii* führte zur Aktivierung von Transposons

(Wu-Scharf *et al.* 2000). Ähnliche Beobachtungen wurde auch für an RNAi beteiligte Gene aus *C. elegans* gemacht (zusammengefasst in Zamore 2001).

In *C. elegans* (*ego1*, Smardon *et al.* 2000) und *A. thaliana* (*argonaute1*, Fagard *et al.* 2000, Morel *et al.* 2002) wurden an RNA-Silencing beteiligte Mutanten identifiziert, die phänotypische Abnormalitäten aufweisen. Dies lässt vermuten, dass RNA-Silencing auch eine Rolle innerhalb der natürlichen Entwicklung dieser Spezies spielen kann. Die Tatsache, dass auch in Pflanzen ein Gen gefunden wurde, welches RNA-Silencing unterdrücken kann, unterstreicht die Annahme einer natürlichen Rolle von RNA-Silencing in natürlichen Entwicklungsprozessen (Anandalakshmi *et al.* 2000).

1.3 Transkriptionelles Gen-Silencing (TGS)

Die transkriptionelle Inaktivierung von Transgenen wird oft im Zusammenhang mit zum Teil aberranten (Mittelsten-Scheid *et al.* 1991, Park *et al.* 1996, Furner *et al.* 1998) oder auch als IRs angeordneten Transgen-Kopien gefunden (Jakowitsch *et al.* 1999, Vaucheret *et al.* 1996). In einer anderen Untersuchung wurde festgestellt, dass auch in Tandem organisierte Transgene transkriptionell inaktiviert werden können. Die in Tandem organisierten Transgene befanden sich auf einer T-DNA, die als Einzelkopie in *A. thaliana* vorlag (Assaad *et al.* 1993, Ye und Signer 1996).

Es wurde vorgeschlagen, dass TGS durch Paarung homologer DNA-Sequenzen vermittelt wird (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). DNA/DNA Interaktionen werden in *Neurospora crassa* für den als RIP („repeat induced point mutation“) bezeichneten Prozess verantwortlich gemacht, bei dem in homologen Sequenzen, die länger als 500 bp sind, zahlreiche Punktmutationen eingefügt werden. Transkriptionell aktive Sequenzen werden dadurch inaktiviert (zusammengefasst in Selker 1999).

Die transkriptionelle Inaktivierung eines Transgens in Petunie, das lediglich in einer Kopie vorlag, ist ebenfalls dokumentiert. Hier wurden die Integration der transformierten T-DNA in stark methylierte chromosomale Bereiche oder der deutlich unterschiedliche GC-Gehalt von Transgen und flankierender genomischer Sequenz für die Inaktivierung verantwortlich gemacht (Pröls und Meyer 1992). Ein weiterer Fall transkriptioneller Inaktivierung eines lediglich in einer Kopie in *A. thaliana* vorliegenden Transgens wurde von Day *et al.* (2000) beschrieben. In diesem Fall wurde vermutet, dass die Transformationsmethode des „nackten DNA-Transfers“ zu vererbaren epigenetischen Veränderungen der Transgen-Sequenz geführt hatte, die die Expression des Transgens unterdrückten.

Einige der TGS-Phänomene könnten nicht DNA- sondern RNA-vermittelt sein. Die Expression einer invertierten Sequenzwiederholung des pnos-Promotors führte zu TGS von weiteren Transgenen, die unter der Kontrolle des pnos-Promotors standen. Dies war verbunden mit verstärkter Methylierung und Auftreten von siRNAs der Sequenz des pnos-Promotors (Mette *et al.* 2000). In Analogie zur Induktion des RNA-Silencing durch rekombinante Viren konnte TGS auch durch Viren induziert werden, deren Genom homologe Sequenzen zum Promotor eines Transgens trug (Al-Kaff *et al.* 1998, Jones *et al.* 1999). Im Gegensatz zu Virus-induziertem RNA-Silencing wird Virus-induziertes TGS meiotisch vererbt (Jones *et al.* 2001). Zusammengefasst machen die letztgenannten Beispiele deutlich, dass dsRNA sowohl TGS als auch RNA-Silencing auslösen kann, je nachdem, ob eine Sequenzhomologie zum Promotor (TGS) oder der transkribierten Sequenz eines Gens vorliegt (RNA-Silencing) (zusammengefasst in Vaucheret und Fagard 2001).

1.4 Das gewählte Untersuchungssystem

Aus den bisherigen Ausführungen lässt sich schließen, dass die Expression von Transgenen bzw. deren Inaktivierung in gentechnisch modifizierten Pflanzen von einer großen Zahl von Parametern beeinflusst wird. Für eine fundierte Analyse ist es daher unumgänglich, definierte, konstante und steuerbare Untersuchungsbedingungen herzustellen. Andernfalls ist keine eindeutige Interpretation des resultierenden Expressionsmusters möglich. In vielen bisherigen Untersuchungen waren einige wichtige Parameter nur unzureichend ermittelt worden. So wurde z. B. selten die Zahl der Transgenkopien oder deren Integrationsort im Genom der untersuchten Pflanzen exakt bestimmt.

Das zu etablierende Untersuchungssystem muss folgenden Ansprüchen genügen: Es muss gewährleisten, Reportergenkonstrukte mit definierter Struktur und Anzahl in verschiedenste Positionen des Genoms der gewählten Modellpflanze zu integrieren. Dieser Integrationsort sollte leicht ermittelt werden können. Die etablierten transgenen Pflanzenlinien sollten einfach zu erhalten sein, wenig Platz beanspruchen und eine kurze Generationszeit besitzen. Kreuzungen zwischen Linien mit unterschiedlichen Reportergenkonstrukten müssen möglich sein.

Aufgrund dieser Anforderungen wurde ein Untersuchungssystem etabliert, bei dem mittels *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) vermittelter T-DNA-Transformation

unterschiedliche Reportergenkonstrukte in *A. thaliana* und *N. tabacum* eingebracht wurden. Diese Transformationsmethode wurde gewählt, weil für sie bekannt ist, dass sie zu einer vergleichsweise geringen Anzahl von T-DNA-Integrationen mit niedriger Komplexität führt (zusammengefasst in Tinland 1996).

Die Zahl der Integrationen und der Integrationsort sind mit keiner der zur Zeit verfügbaren Transformationsmethoden in Pflanzen steuerbar. Daher wurden umfangreiche genetische und molekularbiologische Analysen durchgeführt, um Pflanzenlinien zu identifizieren, die lediglich eine vollständige Kopie der transformierten T-DNA in ihrem Genom integriert haben.

Die gewählte Modellpflanze *A. thaliana* ist bei geringem Platzbedarf einfach zu kultivieren und erzeugt durch Selbstbestäubung nach nur 8 Wochen Generationszeit bis zu 10.000 Samen pro Individuum. Kreuzungen zwischen verschiedenen Individuen sind unkompliziert. Das Genom der diploiden Pflanze *A. thaliana* ist bei hoher Gendichte arm an repetitiven Sequenzen, mit 125 Mb vergleichsweise klein und mit Ausnahme der hochrepetitiven Bereiche vollständig sequenziert (The *Arabidopsis* Genome Initiative 2000). Daher ist die Position von T-DNA-Integrationen im *A. thaliana* Genom mittels geeigneter molekularbiologischer Methoden einfach zu ermitteln.

Um die Übertragbarkeit einiger der gewonnenen Ergebnisse auf andere Spezies zu testen, wurde als zweite Modellpflanze *N. tabacum* gewählt. Das amphidiploide Genom dieser Spezies ist im Vergleich zu *A. thaliana* 30-fach größer und wesentlich reicher an repetitiven Sequenzen (Arumuganathan und Earle 1991, Dean und Schmidt 1995). Bei ebenfalls sehr hoher Nachkommenzahl besitzt *N. tabacum* eine Generationszeit von ca. 12 Wochen.

Als Reporter zur Bestimmung der Transgenexpression wurden das β -Glucuronidasegen (GUS, Jefferson *et al.* 1987), das Streptomycinphosphotransferasegen (SPT, Maliga *et al.* 1988) und das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP, Calfie *et al.* 1994) gewählt. Die Aktivität der entsprechenden Proteine ist sowohl qualitativ, als auch mit molekularbiologischen Techniken quantitativ leicht zu bestimmen.

Die vorliegende Arbeit war Teil eines umfangreichen Projektes, welches den Einfluss verschiedener Parameter auf die Expression von Transgenen untersucht. So konnte bereits gezeigt werden, dass der Integrationsort von Transgenen, die unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehen, keinen wesentlichen Einfluss auf ihre Expression in *A. thaliana* hat (Lechtenberg 1999, Schubert 1999, Gils 2000, Forsbach 2001, Schubert 2002). Ferner konnte belegt werden, dass das Silencing der Transgene mit dem

Überschreiten eines transkriptionellen Schwellenwertes korrelierte. Vorliegende Promotorhomologien lösten dagegen ebenso wenig Silencing aus wie direkte oder invertierte Sequenzwiederholungen (Lechtenberg 1999, Forsbach 2001, Schubert 2002). Effektiv im Auslösen von Silencing war dagegen die gleichzeitige Anwesenheit von Transgenkopien in *sense* und *antisense* Orientierung (Forsbach 2001).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten wichtige Fragestellungen zur Expression und Inaktivierung von Transgenen in Pflanzen bearbeitet werden. Vorhergehende Analysen hatten gezeigt, dass ein oder zwei Kopien des β -Glucuronidasegens (GUS) unter der Kontrolle des starken CaMV 35S-Promotors stabil und hoch in *A. thaliana* exprimiert werden können. Die Expression von drei oder mehr Kopien des GUS-Gens führte zu Silencing (Lechtenberg 1999, Schubert 1999, Gils 2000). Die gleichzeitige Expression einer Kopie des GUS-Gens in *sense* und *antisense* Orientierung, beide unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, führte ebenfalls zu Silencing (Forsbach 2001).

Ein Vergleich der Transgenexpression in Linien, die bis zu sechs Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des schwachen Promotors des Nopalinsynthasegens (pnos) trugen, zu solchen Linien, deren GUS-Gene unter der Kontrolle des starken CaMV 35S-Promotors stand, sollte klären, ob es auch bei schwach exprimierten Genen mit erhöhter Kopienzahl zum Silencing kommt und welche weiteren Faktoren die Expression von Transgenen unter der Kontrolle starker bzw. schwacher Promotoren beeinflussen.

Anhand transgener *A. thaliana* Linien, die zwei oder drei verschiedene Transgene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in Tandem auf einer T-DNA trugen, sollte analysiert werden, ob eine stabile Expression auch für mehr als ein Transgen möglich ist und inwieweit sich verschiedene Transgene gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen. Desweiteren sollte untersucht werden, wie sich Silencing des GUS-Gens, hervorgerufen durch die Expression von drei oder mehr Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors bzw. durch die gleichzeitige Expression einer *sense* und *antisense* Kopie des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, auf andere Transgene auswirkt, die in transkribierten Bereichen Homologie zum GUS-Gen aufweisen.

Um zu überprüfen, ob die in *A. thaliana* erhaltenen Ergebnisse Aussagen über die Transgen-Expression in Pflanzenspezies mit unterschiedlicher Genomstruktur zulassen,

sollte die Expression des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in transgenen *N. tabacum* Linien analysiert werden.

Ferner sollte die Analyse einer Population transgener *A. thaliana* Pflanzen, die mit einer T-DNA, die ein GUS-Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors trug, transformiert worden waren, zeigen, welche Einflüsse für die häufig in transgenen Populationen beobachtete große Variabilität der Transgenexpression verantwortlich sind.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht im weiteren gesondert aufgeführt, wurden alle Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Amersham, Freiburg:	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, Hybond-N ⁺ -Membran
Bio-Rad, Richmond, USA:	Bio-Rad Protein-Assay
Difco Laboratories, Augsburg:	Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Hefe-Extrakt, Pepton, Rindfleischextrakt
Duchefa, Haarlem, Niederlande:	BAP, Claforan, Diethylpyruvylcarbonat, Gelrite, Kanamycin, 4-MUG, MS-Medium M0222, MS-Medium+Vitamine M0245, NAA, Pflanzenagar, Rifampicin, Streptomycin, Tetracyclin, X-Gluc
Eurogentec, Seraing, Belgien:	Oligonukleotide
Gibco BRL, Eggenstein:	Agarose, Oligonukleotide, Taq-DNA-Polymerase, Tris
Hartmann, Braunschweig:	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP
JT Baker, Holland:	Borsäure
Macherey & Nagel, Düren:	Nucleobond AX Membran, Porablot NY Plus Membran
MBI Fermentas, St. Leon-Roth:	BSA, Restriktionsendonukleasen, DNA-Polymerase (Klenow-Fragment), DNA-Längenstandard (GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter, <i>EcoRI/HindIII</i> gespaltene λ -DNA, λ -DNA, dNTPs, T7 Transcription Kit #K0412
Metabion, Martinsried:	Oligonukleotide
MWG, Ebersbach:	Oligonukleotide
NEB, Bad Schwallbach:	T4-DNA Ligase (2000000 U/ml)
Pall, Dreieich:	Biodyne A Membran, Biodyne B Membran
PeqLab Biotechnologie, Erlangen:	peqGOLD RNA Pure™
Pharmacia, Freiburg:	Ficoll
Promega, Mannheim	pGem-T Vektor System I
QIAGEN, Hilden	RNAeasy Kit
Roche, Mannheim:	Restriktionsendonukleasen, High Pure PCR Purification Kit, High Pure Plasmid Purification Kit™, p(dN) ₆ , RNase A

Serva, Heidelberg:	Bromphenolblau, Ethidiumbromid, MOPS, Triton X 100, Xylencyanol
Sigma Chem. Co., Deisenhofen:	deionisiertes Formamid, Kodak-X-OMAT AR-5 Filme, 4-MU, PVP
Whatman, Maidstone:	3MM Chromatographie-Papier

2.2 Medien

Sämtliche Medien wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Vitamine, Antibiotika und Hormone wurden, falls erforderlich, nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.2.1 Medien für *E. coli*

LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7 mit KOH
LB+Agar:	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

2.2.2 Medien für *A. tumefaciens*

YEB-Medium:	0,5 % (w/v) Rindfleisch-Extrakt 0,1 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Saccharose 2 mM Magnesiumsulfat pH 7,2 mit NaOH
YEB+Agar:	YEB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar

2.2.3 Medien für die axenische Kultur von *A. thaliana*

MS-Medium (M0222) wurde mit 9 g/l Bacto-Agar versetzt.

AM:	0,23 % (w/v) MS-Medium (pH 6,0) mit 1 % (w/v) Saccharose
MG:	0,46 % (w/v) MS-Medium (pH 5,8) mit 1,6 % (w/v) Glukose

2.2.4 Medien für die Transformation und Anzucht von *N. tabacum*

MSO:	0,44 % (w/v) MS-Medium (M0245) (pH 5,7) mit 3 % (w/v) Saccharose
MSO+Agar:	MSO mit 0,8 % (w/v) Bacto-Agar
MSS (Kalli):	MSO mit 0,8 % (w/v) Pflanzenagar, 0,9 mg/l Thiamin-HCl, 50 mg/l Claforan, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, 100 mg/l Kanamycin
MSS (Stecklinge):	MSO mit 0,3 % (w/v) Gelrite, 35 mg/l Claforan, 100 mg/l Kanamycin

2.3 Antibiotika Konzentrationen

Für Selektionsexperimente wurden folgende Antibiotika Konzentrationen verwendet:

a) Bakterienselektionsmedien:	Ampicillin:	100 µg/ml
	Rifampicin:	100 µg/ml
	Streptomycin:	200 µg/ml
	Tetracyclin:	10 µg/ml (zur Selektion von <i>E. coli</i>) 1 µg/ml (zur Selektion von <i>A. tumefaciens</i>)
b) Pflanzenselektionsmedien:	Kanamycin:	50 µg/ml für <i>A. thaliana</i> 200 µg/ml für <i>N. tabacum</i>
	Streptomycin:	200 µg/ml

2.4 Oligonukleotide

a) Für die Herstellung von Sonden und als Größenstandards beim Nachweis von siRNAs eingesetzte Oligonukleotide:

GUS:	GUS F:	5'-GCCGGGCAATTGCTGTGCCAGG-3'
	GUS R:	5'-CGCCTGTAAGTGCCTTGCTGAG-3'
Erwartete Produktlänge: ca. 1050 bp		
GUS3':	GUS 3' Rev:	5'-CGAAGTTCATGCCAGTCCAG-3'
	GUS B Rev:	5'-CTCAGCAAGCGCACTTACAGG-3'
Erwartete Produktlänge: ca. 630 bp		
GFP:	GFP A:	5'-GGTGAAGGTGATGCAACATACG-3'
	GFP B:	5'-CAAGAAGGACCATGTGGTCTC-3'
Erwartete Produktlänge: ca. 570 bp		
35S-:	35S-F:	5'-CTGACCCACAGATGGTTAGAG-3'
	35S-R:	5'-GTGGAGATGTCACATCAATCC-3'
Erwartete Produktlänge: ca. 720 bp		
OCS:	OCS F:	5'-GAGCATGTGTAGCTCAGATCC-3'
	OCS R:	5'-GCACCTTCCATAGTCCCTCG-3'
Erwartete Produktlänge: ca. 780 bp		
OCSEX:	OCS-Ex-For:	5'-CCTGCTTTAATGAGATATGCGAG-3'
	OCS-Ex-Rev:	5'-GTACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'
Erwartete Produktlänge: ca. 200 bp		

SPT:	SPT F:	5'-CCCACTCAAGCTGGATACTTCC-3'
	SPT R:	5'-CCATAGCGTTTACGGCCAGATC-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 730 bp (PCR mit 2 % DMSO)	
RB:	RB-Out:	5'-GACGGCAATTTTCGATGATGCAG-3'
	RB-B:	5'-GCCAGTCAGCATCATCACAC-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 1040 bp	
LB:	LB-B:	5'-CGACGTGTCTACATTCACGTC-3'
	NPT-out:	5'-GAACCTGCGTGCAATCCATC-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 720 bp	
HPT:	HPT 1:	5'-GACCTGATGCAGCTCTCGGA-3'
	HPT 2:	5'-CGCACTGACGGTGTCGTCCA-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 450 bp	
NPT:	NPT 1:	5'-AGACAATCGGCTGCTCTGAT-3'
	NPT 2:	5'-CCGCTCAGAAGAACTCGTCA-3'
	Erwartete Produktlänge: ca. 720 bp	
AKTIN:	ACTIN-FOR:	5'-TGTTGGTGATGAAGCACAATCC-3'
	ACTIN-R2:	5'-ACGACCTTAATCTTCATGCTGCT-3'
	Die Oligonukleotide binden an zwei <i>A. thaliana</i> Aktine (An <i>et al.</i> 1996). Erwartete Produktlänge der Aktine 2 und 8: ca. 700 bp	

b) Als Größenstandards beim Nachweis von siRNAs eingesetzte Oligonukleotide:

SPTMET: 5'-GCACCTTCGACTATGCCAACATC-3'

GFPSEQ: 5'-TCGAGCTTAAGGGAATCGATTTC-3'

2.5 Biologisches Material

2.5.1 Pflanzen

Arabidopsis thaliana: Ökotyp Columbia (Inventarnummer CS3180 des *Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC).

Nicotiana tabacum: *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

2.5.2 Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α (Hanahan 1983): Dieser Stamm wurde zum Erhalt der Hochkopienzahl Plasmide sowie für Klonierungen verwendet.

- E. coli* SURE™ 2 (Stratagene, La Jolla, USA) Dieser Stamm wurde zum Erhalt der T-DNA Vektoren sowie für Klonierungen verwendet.
- A. tumefaciens* LBA 4404 (Hoekema *et al.* 1983): Dieser nicht onkogene Stamm besitzt Streptomycin- und Rifampicin-Resistenzen und wurde für die Pflanzentransformation eingesetzt.

2.5.3 Vektoren

Die verwendeten Hochkopienzahl Plasmide für das GUS-Gen (SLJ4D4), das GFP- (pBIN mGFP5-ER) sowie für das SPT-Gen (SLJ1491) sind Derivate des Vektors pUC118 (Jones *et al.* 1992). Alle verwendeten Hochkopienzahl Plasmide vermitteln Ampicillin Resistenz. Die binären T-DNA Vektoren sind Derivate des Plasmids SLJ7292 (Jones *et al.* 1992). Sie tragen ein Tetracyclin Resistenzgen.

2.5.4 Verwendete T-DNA-Konstrukte

Grundlage aller in Abb. 1 und 2 dargestellten T-DNA-Konstrukte ist der binäre Vektor SLJ7292 (Jones *et al.* 1992). Er besitzt Replikationsursprünge zur Amplifikation in *E. coli* und *A. tumefaciens*. Als pflanzlicher Transformationsmarker dient ein Neomycinphosphotransferasegen (NPT, Matsumura *et al.* 1984) unter der Kontrolle des *nos*-Promotors (Depicker *et al.* 1982) gefolgt vom *ocs3'*-Ende (De Greve *et al.* 1982). Als Reportergene wurden das β -Glucuronidasegen (GUS, Jefferson *et al.* 1987), das Streptomycinphosphotransferasegen (SPT, Maliga *et al.* 1988) und das Gen für das grün fluoreszierende Protein (mGFP5-ER, Haselhoff *et al.* 1997, Siemering *et al.* 1996) ausgewählt. Sie befinden sich unter der Kontrolle des CaMV 35S- (Odell *et al.* 1984) bzw. des *nos*-Promotors (Depicker *et al.* 1982) und werden gefolgt von einem *ocs3'*-Ende (De Greve *et al.* 1982). Diese Reportergenkassetten werden rechts und links von zwei Hälften eines *Ds*-Elementes flankiert. Dabei handelt es sich um ein nicht zur autonomen Transposition fähiges Derivat des *Ac*-Elementes. Beide Elemente wurden ursprünglich in Mais identifiziert (McClintock 1951) und konnten später heterolog in *A. thaliana* etabliert werden (Bancroft *et al.* 1992). Bei Anwesenheit einer geeigneten Transposasequelle (Δ *NaeI* *sAc*, Bancroft *et al.* 1992) ist eine Transposition des *Ds*-Elementes, inklusive der Reportergene in andere Positionen des Wirtsgenoms möglich. Um eine Exzision des *Ds*-

Elementes nachweisen zu können, wurde es zwischen die Sequenz des p1'-Promotors des Mannopinsynthasegens (Velten *et al.* 1984) und die kodierende Sequenz des Hygromycinphosphotransferasegens (Malpartida *et al.* 1983) kloniert.

Zusätzlich wurden T-DNA-Konstrukte erzeugt, in denen *Ds*-Element und Hygromycinphosphotransferasegen fehlen (Abb. 2).

Die Nomenklatur der T-DNAs setzt sich aus Abkürzungen der beinhalteten Reportergene bzw. deren Kopienzahl zusammen. Die Großbuchstaben F und R bezeichnen die Transkriptionsrichtung der Transgene in Bezug zur T-DNA (Abb. 1). Wenn die Unterscheidung in F und R T-DNA für die Besprechung nicht sinnvoll ist, wird sie im weiteren weggelassen. So können z. B. gsF- und gsR-T-DNAs als gs-T-DNAs zusammengefasst werden. Des Weiteren werden in der Besprechung Linien, die eine bestimmte T-DNA tragen, verkürzend mit deren Namen bezeichnet. Linien, die eine gsm-T-DNA tragen, werden z. B. so als gsm-Linien bezeichnet.

2.5.5 Klonierung der verwendeten T-DNA-Konstrukte

Ein Teil der verwendeten T-DNA-Konstrukte lag mit Beginn dieser Arbeit bereits vor. So die gsF-, gsR-, gsgF-, gsgR-, gsmF-, mgfpF-, mgfpR-T-DNA-Konstrukte (Bahadur, Gils unveröffentlicht) sowie das gsmR-T-DNA-Konstrukt (Bahadur unveröffentlicht, Lechtenberg 1999).

Zur Erzeugung der DgF- bzw. DgR-T-DNA-Konstrukte wurde ein *HindIII* Restriktionsfragment des Vektors SLJGUS (Bahadur unveröffentlicht), das die Sequenz 35S::GUS::ocs3' trägt, in beiden Orientierungen in die *HindIII* Restriktionsschnittstelle des Vektors SLJ7292 (Jones *et al.* 1992) ligiert.

Zur Erzeugung der pgR-T-DNA-Konstrukte wurde das 313 bp *SmaI/SalI* Restriktionsfragment des Vektors pBHPT (Wiens unveröffentlicht), dessen 5' überhängende Enden aufgefüllt worden waren, in den *SalI/XhoI* restringierten Vektor SLJGUS (Bahadur unveröffentlicht), dessen 5' überhängende Enden ebenfalls aufgefüllt worden waren, ligiert. Der resultierende Vektor GUS-NOS trägt eine pnos::GUS::ocs3' Reportergenkassette. Diese wurde mittels *HindIII* Restriktion in den Vektor SLJDsHPT (Bahadur unveröffentlicht) ligiert und führte so zum pgR-T-DNA-Konstrukt.

Zur Erzeugung der pg2R-T-DNA-Konstrukte wurde zunächst das 331 bp *HindIII/SacI* Fragment des Vektors GUS-NOS in den ebenfalls *HindIII/SacI* restringierten Vektor pSP73HK-CaMV 35S-(f) (Bahadur unveröffentlicht) ligiert. Der entstandene Vektor

pSP73HK-pnos(f) trug statt der 35S nun die pnos Sequenz. Parallel dazu wurde durch Restriktion mit *XhoI*, Auffüllen der überhängenden 5'-Enden und erneute Ligation die *XhoI* Restriktionsschnittstelle des Vektors GUS-NOS zerstört. Der resultierende Vektor wurde mit GUS-NOS-*XhoI*K bezeichnet. Nun wurde mittels *HindIII* Restriktion die pnos::GUS::ocs3' Kasette des Vektors GUS-NOS-*XhoI*K in den Vektor pSP73HK-pnos(f) ligiert. Es entstand der Vektor NOS-GUS-NOS. Aus diesem wurde durch *XhoI* Restriktion die pnos::ocs3'::GUS::pnos Sequenz in den Vektor SLJDsHPT-GUS(G1XR) Δ *XhoI* (Bahadur unveröffentlicht) eingefügt. Dadurch entstand das pg2R-T-DNA-Konstrukt.

Zur Erzeugung des pg3R-T-DNA-Konstruktes wurde zunächst mittels *HindIII* Restriktion die pnos::GUS::ocs3' Sequenz aus dem Vektor GUS-NOS-*XhoI*K in den Vektor SLJDsHPT-GUS(G1XR) Δ *XhoI* (Bahadur unveröffentlicht) ligiert. Der resultierende Vektor wurde mit GUS-NOS-GUS bezeichnet. In diesen wurde nun durch *XhoI* Restriktion die pnos::ocs3'::GUS::pnos Sequenz des Vektors NOS-GUS-NOS ligiert und so das pg3R-T-DNA-Konstrukt erzeugt.

2.6 Methoden

2.6.1 Gängige Labortechniken

Alle molekularbiologischen Techniken entsprachen, wenn nicht im folgenden gesondert beschrieben, den gängigen Laborstandards nach Sambrook *et al.* (1989).

2.6.2 Wachstumsbedingungen der Pflanzen

Die Pflanzen wurden zunächst in Sterilkultur auf Agarplatten in der Klimakammer angezogen und nach zwei Wochen in Erde oder Reagenzgläser mit Agar-Medium umgesetzt.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in zwei verschiedenen Instituten durchgeführt. Daher unterschieden sich die Wachstumsbedingungen der Pflanzen, wie im folgenden aufgeführt.

Langtagbedingungen im Gewächshaus und in der Klimakammer für *A. thaliana*:

MDL in der MPG, Köln: 16 h Licht bei 20 °C, 8 h Dunkel bei 18 °C,
Luftfeuchtigkeit jeweils 70 %

MPIMP, Golm: 16 h Licht bei 20 °C, Luftfeuchtigkeit 80 %
8 h Dunkel bei 18°C, Luftfeuchtigkeit 50 %

Kurztagbedingungen in der Klimakammer für *A. thaliana*:

MDL in der MPG, Köln: 9 h Licht bei 20 °C, 15 h Dunkel bei 18 °C,
Luftfeuchtigkeit jeweils 70 %

MPIMP, Golm: 8 h Licht bei 20 °C, Luftfeuchtigkeit 60 %
16 h Dunkel bei 16 °C,
Luftfeuchtigkeit 75 %

Langtagbedingungen im Gewächshaus und in der Klimakammer für *N. tabacum*:

MDL in der MPG, Köln: Gewächshaus siehe *A. thaliana*, Klimakammer 16 h
Licht bei 24 °C, 8 h Dunkel bei 20 °C,
Luftfeuchtigkeit 70 %

MPIMP, Golm: 16 h Licht bei 26 °C, 8 h Dunkel bei 20 °C,
Luftfeuchtigkeit 60 - 70 %

2.6.3 Oberflächensterilisation von Samen

Bis zu ca. 500 Samen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen sterilisiert. Dabei wurden die Samen zunächst 3 min in 70 %igem Ethanol und anschließend 3 min in einer 0,84 %igen Natriumhypochloridlösung geschwenkt. Es folgten zwei Waschschrte mit sterilem Wasser.

2.6.4 Agrobakterien-vermittelte Blattstückchentransformation von *N. tabacum*

Die Transformation von *N. tabacum* erfolgte nach Horsch *et al.* (1985). Der zur Transformation verwendete *A. tumefaciens* Stamm wurde bei 28 °C für 24 h auf YEB-Platten inklusive der entsprechenden Antibiotika angezogen. Die Bakterien wurden in MSO-Medium suspendiert. Zur Transformation wurden Blätter von 3 - 4 Wochen alten, in axenischer Kultur gezogenen *N. tabacum* Pflanzen verwendet. 8 - 10 mm² große Explantate ohne Mittelrippen wurden 15 min bei RT in der Agrobakterien-Suspension inkubiert, auf Filterpapier abgetupft und mit der Blattoberseite nach unten auf MSO-Medium gelegt. Nach zwei Tagen bei 24 °C im Dunkeln wurden die Blattstücke auf Kanamycin-haltiges MSS(Kalli) Medium transferiert. Alle zwei Wochen wurden die Blattstücke auf frisches Kanamycin-haltiges MSS(Kalli) Medium umgesetzt. Gebildete Sprosse wurden von den Kalli abgetrennt und in Kanamycin-haltiges MSS(Stecklinge) Medium gesetzt. Nach erfolgter Wurzelbildung wurden die Pflanzen in Erde gesetzt und ins Gewächshaus transferiert.

2.6.5 Nomenklatur der Pflanzen

Die transgenen Pflanzenlinien sind mit dem T-DNA-Konstrukt bezeichnet, das zu ihrer Transformation verwendet wurde.

a) *A. thaliana*

Transgene Linien, die aus Agrobakterien-vermittelter Wurzeltransformation hervorgegangen sind (Valvekens *et al.* 1988), wurden mit Zahlen von eins aufwärts bezeichnet. Aus *in planta* Transformationen (Clough und Bent 1998 oder Bechtold *et al.* 1993) hervorgegangene transgene Linien wurden mit Zahlen von 100 aufwärts bezeichnet. Pflanzen einer Linie die in axenischer Kultur gezogen wurden, erhielten zusätzlich eine Ziffer ab 21 aufwärts. Pflanzen einer Linie, die im Gewächshaus gezogen wurden, erhielten zusätzlich eine Ziffer ab 11 aufwärts. Für jede Generation wurde eine weitere Nummer gemäß dem vorgestellten Schema hinzugefügt. Für die T-DNA hemizygote Nachkommen wurden zusätzlich mit „hemiz.“, homozygote Nachkommen mit „homoz.“ gekennzeichnet.

b) *N. tabacum*

Transgene *N. tabacum* Linien wurden nach dem Blattstück und dem Kallus benannt, aus dem sie regeneriert worden waren. Zur Benennung wurden Zahlen verwendet. Getrennt werden beide Zahlen durch das Zeichen #. So wurde die Linie 47#3 aus dem 47ten zur Transformation eingesetzten Blattstück und dem dritten unabhängigen Kallus der sich an diesem bildete regeneriert. Die Linie 47#4 entwickelte sich aus dem vierten unabhängigen Kallus des gleichen Blattstückes. In folgenden Generationen wurden Geschwisterpflanzen durch hinzugefügte Zahlen von eins an aufwärts unterschieden.

2.6.6 Präparation genomischer DNA aus *A. thaliana* und *N. tabacum*

Die Präparation erfolgte modifiziert nach Dellaporta *et al.* (1983).

Extraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8; 50 mM EDTA, pH 8; 500 mM NaCl; 1,65 % (w/v) SDS; unmittelbar vor Gebrauch 0,07 % (v/v) β -Mercaptoethanol zugeben

200 - 500 mg Blattmaterial wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß geerntet, in flüssigem Stickstoff gefroren und gemörsert. Nach Zugabe von 650 μ l Extraktionspuffer wurde

gründlich homogenisiert und geschüttelt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zentrifugation des Homogenats wurde der Überstand mit einem Volumen PC extrahiert. Die resultierende wässrige Oberphase wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Durch erneute Zentrifugation erfolgte die Sedimentation der DNA. Die DNA wurde in 50 - 80 µl H₂O/RNase (0,1 mg/ml) gelöst. Für Southern Blot-Analysen wurde jeweils die Hälfte der gewonnenen DNA eingesetzt. Bei der Isolierung von genomischer DNA aus *N. tabacum* wurde eine zusätzliche Chloroformextraktion durchgeführt.

2.6.7 DNA Transfer auf Nylonmembranen („Southern Blot“) und Hybridisierung der Membranen

Der Transfer von DNA auf Nylonmembranen erfolgte modifiziert nach Southern (1975). Die Transfer- und Hybridisierungsbedingungen entsprachen den Herstellerangaben.

100 x Denhardt´s:	2 % (w/v) BSA; 2 % (w/v) Ficoll; 2 % (w/v) PVP
SSPE:	50 mM NaCl; 10 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 0,1 mM EDTA; pH 7,4 mit NaOH
Hybridisierungslösung:	5 x Denhardt´s; 5 x SSPE; 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung:	2 x SSPE; 0,1 % (w/v) SDS

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach vierstündiger Prähybridisierung bei 65 °C über Nacht in einer Glasröhre im Rolleninkubator Heraeus HeraHybrid der Firma Heraeus, Hanau. Die Membran wurde zweimal 20 min bei 65 °C gewaschen.

2.6.8 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von Sonden erfolgte nach einem Protokoll von Feinberg und Vogelstein (1983).

Lösung O:	0,125 M Tris/HCl, pH 8; 0,125 M MgCl ₂
Lösung A:	1 ml Lösung O; 18 µl β-Mercaptoethanol; 5 µl dATP, 5 µl dGTP, 5 µl dTTP (je 100 mM Stammlösung)
Lösung B:	2 M Hepes/NaOH, pH 6,6
Lösung C:	p(dN) ₆ 90 OD ₂₆₀ /ml
5 x Markierungspuffer:	200 µl Lösung A; 500 µl Lösung B; 300 µl Lösung C

20 - 100 ng der Matrizenstrang-DNA, in 16 µl H₂O, wurden nach 10-minütiger Denaturierung bei 95 °C für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 5 x

Markierungspuffer, 1 μ l Klenow-Enzym (2 U) und 30 μ Ci 32 α -dCTP zugefügt. Die Reaktion wurde mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Proben wurden mit dem High Pure PCR Product Purification KitTM gemäss den Angaben des Herstellers gereinigt. Das Eluat wurde 10 min bei 95 °C denaturiert, 2 min auf Eis inkubiert und in 20 - 25 ml Hybridisierungslösung zu der prähybridisierten Membran gegeben.

2.6.9 Präparation von RNA aus *A. thaliana*

Die Präparation von RNA aus Blättern von *A. thaliana* erfolgte mit Hilfe der PeqGOLD-RNAPureTM Lösung. Es wurde gemäß Herstellerangaben verfahren. Zur Präparation wurden ca. 60 mg Blattmaterial eingesetzt.

Zur Isolierung von siRNAs wurden folgende Änderungen am Herstellerprotokoll vorgenommen: 1. Die Fällung der RNA erfolgte für 20 min bei -20 °C. 2. Auf Waschen der RNA in 70 %igem EtOH wurde verzichtet.

2.6.10 RNA Transfer auf Nylonmembranen („Northern Blot“) und Hybridisierung der Membranen

a) Probenaufbereitung

10 x Elektrophoresepuffer: 0,2 M Mops, pH 7; 80 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA, pH 8

10 x RNA-Blaumarker: 50 % (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA, pH 8; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol

Die isolierte RNA wurde in 50 μ l DEPC behandeltem H₂O aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt, und 7 bis 15 μ g wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s.u.). Zu der RNA Lösung wurden 10 x Elektrophoresepuffer sowie Formaldehyd und deionisiertes Formamid hinzugegeben. Die Endkonzentrationen im Ansatz betragen 1x Elektrophoresepuffer, 40 % Formamid und 2,2 M Formaldehyd. Es folgte eine 10-minütige Denaturierung bei 80 °C und anschließend Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 1,5 μ l Ethidiumbromid (1 mg/ml) und 10 x RNA Blaumarker wurden die Proben in die Geltaschen geladen.

b) Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

Die Konzentration der Gele betrug 1,2 % (w/v) Agarose und 2,2 M Formaldehyd in 1x Elektrophoresepuffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 V über Nacht.

Für die Auftrennung von siRNAs wurden 2,5 %ige (w/v) Agarose-Gele verwendet. In diesen Gelen waren die Geltaschen etwa 4 - 5 cm vom oberen Rand des Gels entfernt. Zunächst erfolgte die Auftrennung der niedermolekularen RNAs für 1 h bei 100 V sowie 1 h bei 20 V innerhalb des 4 - 5 cm langen Gelbereiches. Nach Abtrennen des Gelstücks mit den niedermolekularen RNAs wurde die Polung der Gelkammer vertauscht, um die hochmolekularen RNAs in entgegengesetzter Laufrichtung aufzutrennen. Die Elektrophorese erfolgte nun für 2 h bei 100 V, anschließend über Nacht bei 20 V.

c) Transfer der RNA auf Nylonmembranen

Die RNA wurde auf HybondN⁺-Nylonmembranen transferiert, wobei nach Herstellerangaben verfahren wurde.

d) Hybridisierung der RNA-Membranen

Hybridisierungspuffer nach Church und Gilbert (1984): 7 % (w/v) SDS; 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; 1 mM EDTA

SSPE: 50 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O; 0,1 mM EDTA; pH 7,4 mit NaOH

Waschlösungen: 6 x SSPE, 0,5 % SDS;
4 x SSPE, 0,5 % SDS;
2 x SSPE, 0,5 % SDS;
2 x SSPE, 0,1 % SDS

Die RNA-Membranen wurden bei 68 °C für 30 min prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte anschließend bei 58 °C über Nacht. Zur Detektion von siRNAs wurden die Membranen bei 58 °C prähybridisiert und danach bei 42 °C über Nacht hybridisiert. Die Membranen wurden je 5 min bei RT mit 6 x-, 4 x- und 2 x SSPE, 0,5 % SDS gewaschen. Die Membranen mit hochmolekularen RNAs wurden zusätzlich 30 min bei 60 °C mit 2 x SSPE, 0,1 % SDS, die Membranen mit siRNAs zusätzlich 15 min bei RT mit 2 x SSPE, 0,1 % SDS gewaschen.

2.6.11 β -Glucuronidase-Aktivitätstests

a) Kolorimetrischer (semiquantitativer) β -Glucuronidase-Aktivitätstest

0,5 M Natriumphosphatpuffer: 0,5 M NaH₂PO₄, pH 7
 X-Gluc Puffer: 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7; 1 mM EDTA, pH 8; 0,1 % (v/v) Triton/X/100; 1 mM X-Gluc

Die Inkubation der Blattstücke erfolgte in 100 μ l X-Gluc Puffer bei 37 °C über Nacht in 96er Mikrotiterplatten.

b) Quantitativer β -Glucuronidase-Aktivitätstest

Die Ermittlung der quantitativen Aktivität der β -Glucuronidase erfolgte modifiziert nach Jefferson *et al.* (1987).

Von 8 – 10 Pflanzen einer transgenen Linie wurden 5 bis 10 sehr junge Rosettenblätter geerntet. Durch Homogenisierung dieses Materials und Abzentrifugation der festen Bestandteile wurden zwei Rohextrakte erstellt. Von diesen beiden Extrakten wurde jeweils die Proteinkonzentration bestimmt. Dies erfolgte mit dem Bradford-Reagenz gemäss Herstellerangaben. Im weiteren wurden je zwei Aliquots der Extrakte unabhängig verdünnt und die GUS-Aktivität bestimmt. Nach Anregung bei 360 nm wurde die emittierte Fluoreszenz bei 460 nm gemessen. Zur Messung wurde das Fluorimeter VersaFluor™ der Firma Bio-Rad, Richmond, USA verwendet. Als externer Standard wurde anhand von 4-MU eine Eichgerade mit Konzentrationen zwischen 50 nM und 1 μ M erstellt. Aus diesen vier Messungen wurde ein Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung wurde nach $((n\sum x^2 - (\sum x)^2)/n^2)^{0,5}$ berechnet. Die GUS-Aktivität [pmol 4-MU/min/mg Protein] wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{GUS-Aktivität: } (4 \cdot 10^6 \cdot 1/B \cdot m_1 \cdot F \cdot (E_{455} - E_{455}^0 - b_2)) / (D \cdot C \cdot m_2 \cdot A \cdot (OD_{595} - b_1))$$

wobei A: eingesetzte μ l der Verdünnung; 1/B: Verdünnung; C: Reaktionszeit [min]; D: im Fluorimeter gemessenes Volumen [ml]; F: eingesetztes Volumen in der Proteinbestimmung [μ l]; E₄₅₅: gemessene Fluoreszenz der Probe nach C Minuten; E₄₅₅⁰: gemessene Fluoreszenz des Nullwertes nach C Minuten; OD₅₉₅: gemessene Extinktion bei der Proteinmessung; m₁: Steigung der Proteineichkurve [ml/ μ g]; b₁: Schnittpunkt der Proteineichkurve mit der y-Achse; m₂: Steigung der 4-MU Eichkurve [1/nmol] und b₂: Schnittpunkt der 4-MU Eichkurve mit der y-Achse.

2.6.12 Ermittlung der GFP-Fluoreszenz

a) Quantitative Ermittlung der GFP-Fluoreszenz

Zur quantitativen Bestimmung der GFP-Fluoreszenz wurden pro untersuchter Linie 10 - 15 kleine Rosettenblätter in 1 ml 1 M Tris, pH 8,0 homogenisiert. Je zwei Aliquots des Überstandes wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt. Diese erfolgte mit Bradford-Reagenz gemäss Herstellerangaben. Je zwei weitere Aliquots des Überstandes wurden 1/10 mittels 1 M Tris, pH 8,0 verdünnt. Nach Anregung bei 480 nm wurde die emittierte Fluoreszenz bei 510 nm gemessen. Zur Messung wurde das Fluorimeter VersaFluor™ der Firma Bio-Rad (Richmond, USA), verwendet. Eine Eichung des Geräts erfolgte mittels 1 M Tris, pH 8,0. Die in dieser Lösung gemessenen Werte dienen als Nullpunkt für alle weiteren Messungen. Für jede untersuchte Linie wurde diese Messung zweimal unabhängig durchgeführt, so dass sich in Analogie zum GUS-Aktivitätstest ebenfalls vier Messwerte ergaben. Diese wurden gemittelt und die Standardabweichung errechnet.

b) Photographische Dokumentation der GFP-Fluoreszenz

Zur photographischen Dokumentation der GFP-Fluoreszenz wurde das Fluoreszenzstereomikroskop Leica MZ FL III der Firma Leica (Mannheim), in Verbindung mit der digitalen RT Color Spot Kamera der Firma Visitron Systems GmbH (Puchheim), verwendet. Zur Auswertung wurde die Meta Imaging Series Software Version 4.6 der Firma Universal Imaging Corporation™ (Downingtown, USA) eingesetzt.

Das Fluoreszenzstereomikroskop war mit folgenden Filtern ausgestattet:

GFP2 Filter: Erregerfilter [nm]: 480/ 40 Sperrfilter [nm]: 510

GFP3 Filter: Erregerfilter [nm]: 470/ 40 Sperrfilter [nm]: 525/50

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung transgener *A. thaliana* und *N. tabacum* Einzelkopielinien

Die zur Transformation von *A. thaliana* und *N. tabacum* verwendeten T-DNA-Konstrukte sind in den Abb. 1 und 2 dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der T-DNA-Konstrukte und deren Klonierung findet sich in 2.5.4 und 2.5.5. Die T-DNAs wurden mittels Agrobakterien-vermittelter *in planta* Transformation in *A. thaliana* (Bechtold *et al.* 1993 oder Clough und Bent 1998), und mittels Agrobakterien-vermittelter Blattstückchentransformation in *N. tabacum* eingebracht (Horsch *et al.* 1985).

Um definierte, konstante und steuerbare Untersuchungsbedingungen herzustellen, wurden für die verschiedenen T-DNAs transgene *A. thaliana* Linien etabliert, die lediglich eine vollständige Kopie der jeweiligen T-DNA tragen. Diese sogenannten Einzelkopielinien wurden durch umfangreiche genetische und molekularbiologische Analysen identifiziert (ausführlich beschrieben in Lechtenberg 1999). Alle Linien, die in einer Segregationsanalyse auf Kanamycin-haltigem Medium durch ein Verhältnis von 3:1 von resistenten gegenüber sensitiven Pflanzen eine Integration von T-DNA an einem Locus zeigten, wurden einer Southern Blot-Analyse unterzogen. Durch Spaltung mit Restriktionsenzymen wurden Fragmente erzeugt, die sowohl Sequenzen der T-DNA, als auch die an die LB und RB anschließenden genomischen Sequenzen enthielten. Diese werden als LB- oder RB-flankierende Fragmente bezeichnet und können durch Hybridisierung mit Sonden bestehend aus LB- bzw. RB-Sequenzen detektiert werden. Da die flankierende genomische Sequenz im Anschluss an die LB oder RB für unabhängige T-DNA-Integrationen unterschiedlich ist, variiert auch der Abstand der nächstgelegenen Restriktionsschnittstelle des jeweils gewählten Enzyms. LB- oder RB-flankierende Fragmente besitzen somit für jede T-DNA-Integration eine spezifische Größe. Einzelkopielinien weisen je ein LB- und RB-flankierendes Fragment auf. Zusätzliche Restriktionsanalysen mittels Enzymen, die mehrfach innerhalb der T-DNAs schneiden, zeigen ob dieses vollständig ist. Alle Einzelkopielinien wurden mit mindestens zwei unterschiedlichen Restriktionen auf Vorliegen je nur eines LB- und RB-flankierenden Fragmentes sowie auf Vollständigkeit der T-DNA getestet.

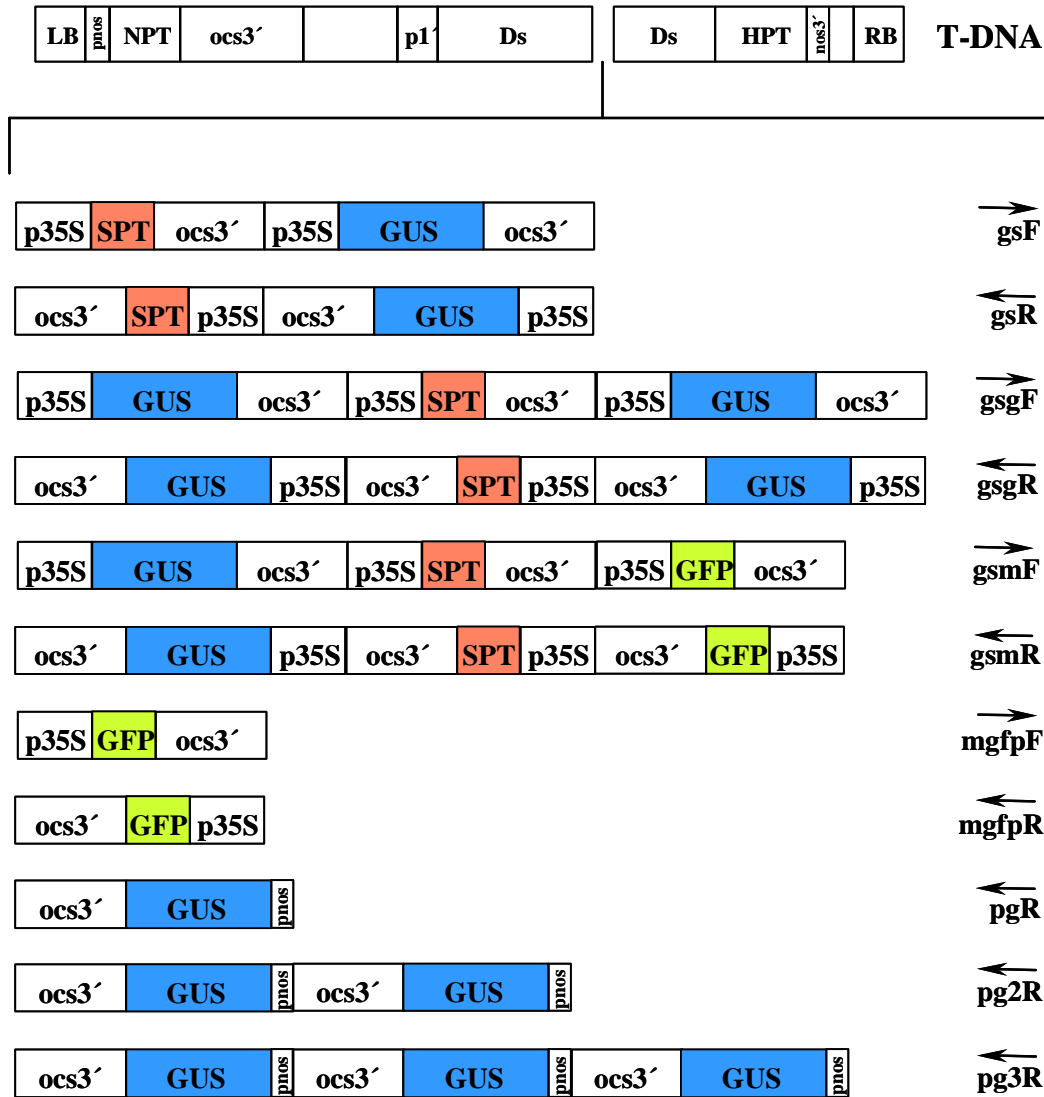


Abbildung 1: Zur Transformation von *A. thaliana* und *N. tabacum* verwendete T-DNA-Konstrukte, die ein *Ds*-Element und das Hygromycinphosphotransferasegen enthalten. Dargestellt ist jeweils lediglich der Bereich der T-DNA des Vektors SLJ7292. Eine ausführliche Beschreibung der T-DNA-Konstrukte findet sich in 2.5.4. Die Klonierung der pg-T-DNA-Konstrukte ist in 2.5.5 beschrieben. Zur Transformation von *N. tabacum* wurden lediglich das gsmF- und gsmR-T-DNA-Konstrukt verwendet. Die gezeigten Reporterengassetten befinden sich jeweils zwischen den zwei Hälften eines *Ds*-Elementes. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Reportergene an. LB = linke Grenze der T-DNA; RB = rechte Grenze der T-DNA; pnos = Promotor des Nopalinsynthasegens; NPT = Neomycinphosphotransferasegen; ocs3' = 3'-Ende des Octopinsynthasegens; p1' = Promotor des Mannopinsynthasegens 1'; *Ds* = Hälften eines *Ds*-Elementes; HPT = Hygromycinphosphotransferasegen; nos3' = 3'-Ende des Nopalinsynthasegens; p35S = 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus; GUS = β -Glucuronidasegen; SPT = Streptomycinphosphotransferasegen; GFP = (mGFP5-ER) Gen für das grün fluoreszierende Protein.

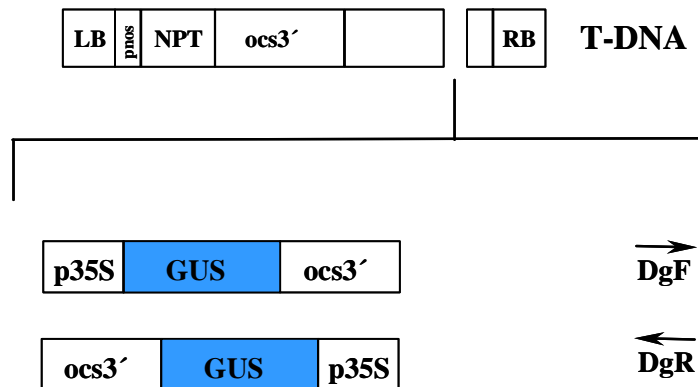


Abbildung 2: Zur Transformation von *A. thaliana* verwendete T-DNA-Konstrukte, die weder ein *Ds*-Element noch ein Hygromycinphosphotransferasegen enthalten. Dargestellt ist jeweils lediglich der Bereich der T-DNA des Vektors SLJ7292. Die Klonierung der gezeigten T-DNA-Konstrukte ist in 2.5.5 beschrieben. Für Abkürzungen siehe Abb. 1.

Linien, die eine invertierte Sequenzwiederholung zweier T-DNAs tragen (IRs), wobei die linken oder rechten Grenzen der T-DNA aneinander grenzen, werden als Auslöser von Silencing diskutiert (zusammengefasst in Muskens *et al.* 2000). Aufgrund ihrer besonderen Struktur sollten LB/LB IRs in der durchgeführten Southern Blot-Analyse zwei RB-flankierende Sequenzen variabler Größe und für die LB ein Fragment vorhersagbarer Größe zeigen. RB/RB IRs sollten umgekehrt zwei LB-flankierende Sequenzen variabler Größe und für die RB ein Fragment vorhersagbarer Größe aufweisen. Linien, die in der Southern Blot-Analyse Hinweise auf eine mögliche invertierte Sequenzwiederholung lieferten, wurden einer zusätzlichen Southern Blot-Analyse unterzogen (Daten nicht gezeigt). Die Analyse zweier RB/RB IRs ist in 3.4.4 beschrieben.

Durch fortgesetzte Segregationsanalysen auf Kanamycin-haltigem Medium wurden für jede *A. thaliana* T-DNA-Einzelkopieline Pflanzen identifiziert, die für die in ihrem Genom integrierte T-DNA homozygot waren. In den durchgeführten Experimenten wurden solche homozygoten Linien verwendet, wenn nicht wird explizit darauf verwiesen.

Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit war ein Teil der transgenen Einzelkopieline bereits etabliert, so für die gsF-, gsR-, gsgF-, gsgR-T-DNAs (Lechtenberg 1999) sowie für die mgfpF- und mgfpR-T-DNAs (Forsbach 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *A. thaliana* Einzelkopieline für die gsmF-, gsmR-, pgR-, pg2R-, pg3R-, DgF- und DgR-T-DNAs etabliert.

Mittels der Technik der iPCR (Ochman *et al.* 1988) wurde für zahlreiche Linien der Integrationsort der T-DNA im Genom von *A. thaliana* ermittelt (Forsbach *et al.* eingereicht

zur Veröffentlichung). Eine Auflistung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten *A. thaliana* Einzelkopielinien findet sich in den Tab. 1 und 2.

Bei den in der Tab. 1 aufgelisteten Linien gsmF 151 und gsmF 154 handelt es sich um Linien, die, vermutlich verursacht durch die Integration der T-DNA, eine rezessive Mutation tragen. Diese führt zu einem embryoethalen Phänotyp. Nur Pflanzen die die T-DNA-Integration hemizygot tragen, sind lebensfähig. An geeigneter Stelle wird hierauf verwiesen.

Tabelle 1

Etablierte *A. thaliana* gs-, gsg-, gsm- und mgfp-Einzelkopielinien, sowie die für einige dieser Linien ermittelten Integrationsorte der T-DNA im Genom von *A. thaliana*

Linie	Integrationsort			
	Chromosom	LB	RB	Gen
gs-T-DNA-Linien				
gsF 100	V	AF058826 (106410)	AF058826 (106378)	
gsF 102	III	AP000375 (35509)	AP000375 (35482)	
gsF 104	V	AL162875 (338)	n.b.	At5g04410
gsF 110	IV	AL161518 (147185)	AL161518 (147207)	At4g10940
gsF 114	IV	AL161515 (96997)	AL161515 (96997)	
gsF 122	IV	AL161510 (158202)	AL161510 (158247)	
gsR 104	n.b.	n.b.	n.b.	
gsR 106	V	AB016885 (47154)	n.b.	At5g58920
gsR 108	V	AB019235 (61413)	n.b.	
gsR 127	V	n.b.	AL590346 (55965)	
gsg-T-DNA-Linien				
gsgF 125	III	AB024038 (57714)	AB024038 (57733)	
gsgF 133	III	AB020749 (20557)	AB020749 (20543)	At3g18080
gsgF 136	V	AB013396 (50109)	AB013396 (51069)	At5g57920
gsgR 114	I	AC036104 (21733)	AC036104 (21754)	At1g21290
gsgR 118	n.b.	n.b.	n.b.	
gsgR 119	V	n.b.	AL590346 (74752)	At5g09230
gsgR 125	V	AB015472 (11997)	AB015472 (12021)	At5g60770
gsgR 129	V	AB016876 (14572)	AB016876 (14596)	At5g39760
gsm-T-DNA-Linien				
gsmF 106	n.b.	n.b.	n.b.	
gsmF 124	n.b.	n.b.	n.b.	
gsmF 126	II	AC002505 (58016)	AC002505 (57991)	
gsmF 130	V	AB024024 (71409)	AB024024 (71433)	At5g44670
gsmF 133	I	n.b.	AC007396 (87773)	At1g76040
gsmF 143	n.b.	n.b.	n.b.	
gsmF 144	IV	AL161538 (150665)	AL161538 (150646)	
gsmF 151	I	AC020579 (4221)	n.b.	At1g74340

gsmF 154	III	AC009853 (86684)	n.b.	At3g07560
gsmR 110	II	AC002387 (97011)	AC002387 (97013)	
gsmR 114	n.b.	n.b.	n.b.	
gsmR 115	I	AC007396 (69203)	AC007396 (69218)	
gsmR 126	V	n.b.	AL162751 (25439)	At5g03340
gsmR 136	n.b.	n.b.	n.b.	
gsmR 137	I	AC004135 (30694)	n.b.	
gsmR 144	n.b.	n.b.	n.b.	
gsmR 163	n.b.	n.b.	n.b.	
mgfp-T-DNA-Linien				
mgfp F 8	I	AC007980 (59674)	AC007980 (59675)	At1g50250
mgfp F 18	III	AB028610 (2325)	AB028610 (2284)	
mgfp F 107	n.b.	n.b.	n.b.	
mgfp F 128	IV	AC016829 (95710)	n.b.	
mgfp R 111	II	AC007019 (101609)	AC007019 (101595)	
mgfp R 129	I	AC003114 (25150)	AC003114 (25133)	At1g09210
mgfp R 145	n.b.	n.b.	n.b.	
mgfp R 155	n.b.	n.b.	n.b.	

Angegeben sind die für die LB- und RB-flankierenden Sequenzen ermittelten T-DNA-Insertionspositionen im Genom von *A. thaliana* durch die Nr. des Chromosoms, die Akzessionsnr. des BAC und, in Klammern, die Position innerhalb des BACs. In den Fällen, in denen eine Integration in einem Gen ermittelt wurde, ist die Akzessionsnr. des Gens angegeben. n.b. = nicht bestimmt.

Tabelle 2
Etablierte *A. thaliana* pg- und Dg-Einzelkopielinien

pgR-T-DNA-Linien	pg2R-T-DNA-Linien	pg3R-T-DNA-Linien	Dg-T-DNA-Linien
pgR 102	pg2R 104	pg3R 103	DgF 101
pgR 106	pg2R 107	pg3R 104	DgF 106
pgR 110	pg2R 108	pg3R 111	DgF 107
pgR 111	pg2R 110	pg3R 114	DgF 108
pgR 122	pg2R 111	pg3R 115	DgF 111
	pg2R 114		DgF 112
	pg2R 118		DgF 117
	pg2R 121		DgF 119
			DgF 123
			DgF 124
			DgR 109

Zur Agrobakterien-vermittelten Blattstückchentransformation von *N. tabacum* wurden das gsmF- und gsmR-T-DNA-Konstrukt eingesetzt (Abb. 1). Die aus den Kalli regenerierten Pflanzen wurden mit Hilfe der oben beschriebenen Southern Blot-Experimente auf die Anwesenheit einer einzigen vollständigen Kopie der T-DNA hin getestet. In nachfolgenden Generationen wurden zusätzlich Segregationsanalysen auf Kanamycin-haltigem Medium durchgeführt. Unter mehr als 300 aus Kalli regenerierten transgenen Pflanzen wurden 18 Einzelkopielinien identifiziert. Für die gsmF-T-DNA waren dies die Linien 6#1, 10#3, 15#1, 34#1, 47#3, 47#4, 51#2, 130#1 und 141#1, für die gsmR-T-DNA waren dies die Linien 27#2, 38#1, 38#3, 55#1, 66#4, 102#1, 103#2, 111#3 und 120#3. Die Integrationsorte der T-DNA im Tabakgenom wurden nicht ermittelt.

3.2 Gleichzeitige Expression unterschiedlicher Transgene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in *A. thaliana*

3.2.1 Gleichzeitige, stabile und koordinierte Expression von GUS-, SPT- und GFP-Reportergenen, die sich in Tandem auf einer T-DNA befinden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Reportergene verwendet: das GUS-, das SPT-, und das GFP-Gen. Diese Reportergene stehen unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV 35S-Promotor). Sie sind in unterschiedlichen Kombinationen und Orientierungen in den gs- und gsm-T-DNAs enthalten (Abb. 1). Für die 10 transgenen *A. thaliana* Einzelkopielinien, die eine gs-T-DNA in ihrem Genom tragen (Tab. 1), war eine stabile und hohe Expression des GUS-Gens bereits nachgewiesen (Lechtenberg 1999). Es blieb zu zeigen, ob dies auch für die Expression des SPT-Gens zutrifft. Zusätzlich wurden 17 *A. thaliana* Einzelkopielinien etabliert, die eine gsm-T-DNA in ihrem Genom integriert tragen (Tab. 1). Anhand dieser Linien sollte überprüft werden, inwieweit drei unterschiedliche Reportergene gleichzeitig unter der Kontrolle eines vergleichsweise starken Promotors in *A. thaliana* exprimiert werden, und ob sie sich in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen.

In Abb. 3 ist die gleichzeitige stabile Expression aller drei Reportergene in homozygoten gsm-Linien dokumentiert.

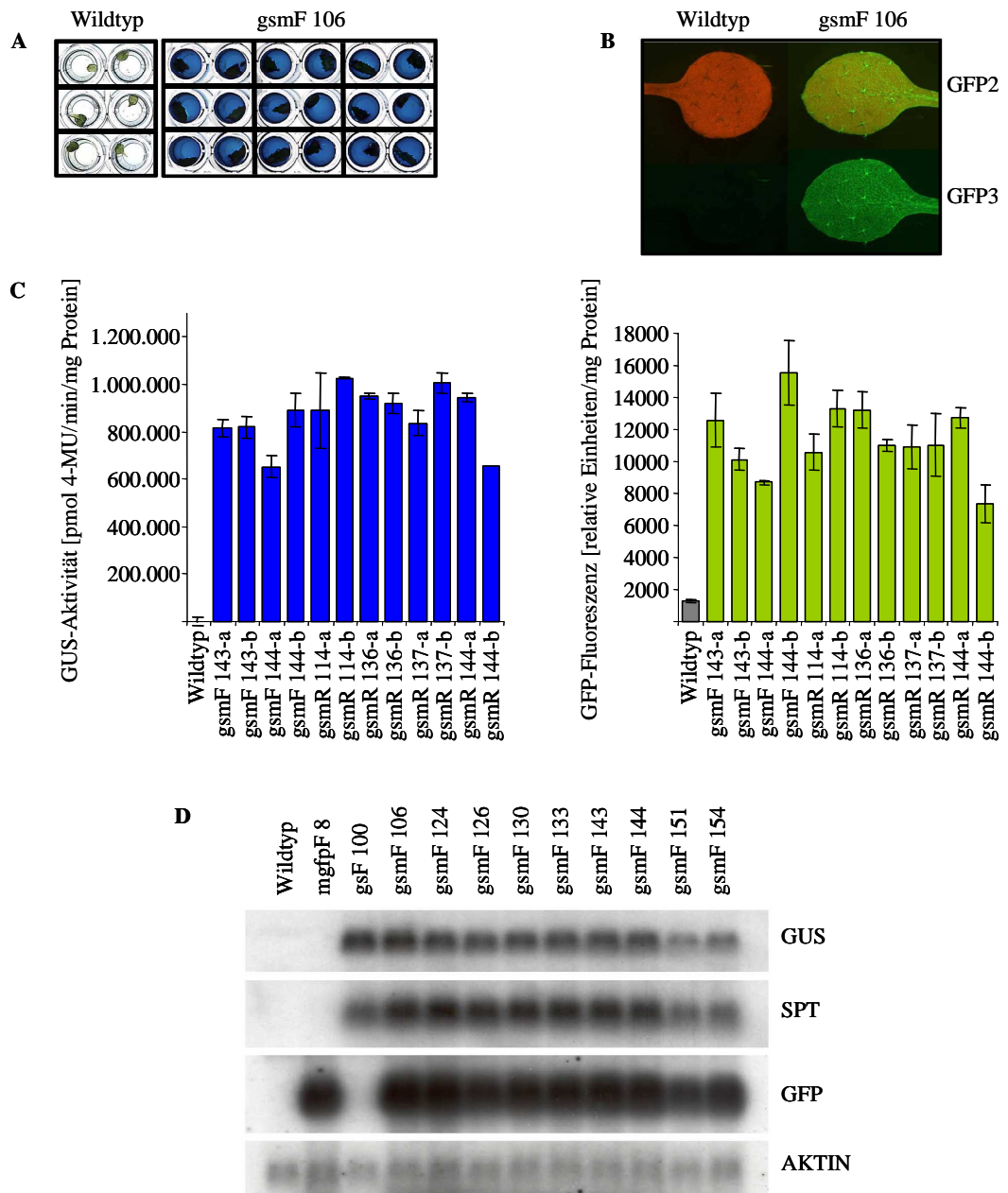


Abbildung 3: Expression des GUS-, SPT- und GFP-Gens in gs- bzw. gsm-Linien.

A) Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests 8 Wochen alter Pflanzen der Linie gsmF 106. Pro Pflanze wurden zwei kleine Rosettenblätter für den Test verwendet. Als Kontrolle dienten *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. **B)** Fotografischer Nachweis der GFP-Fluoreszenz anhand der Linie gsmF 106. Als Kontrolle diente *A. thaliana* Wildtyp. Die Aufnahmen erfolgten mit dem GFP2- und GFP3-Filter. **C)** Ergebnisse quantitativer GUS-Aktivitätstests (links) und GFP-Fluoreszenzmessungen (rechts). Für die Tests wurden 8 Wochen alte Pflanzen 6 unabhängiger gsm-Linien verwendet. Von jeder Linie wurden jeweils zwei Geschwisterlinien analysiert (a und b). Als Kontrolle dienten *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **D)** Northern Blot-Analyse anhand 8 Wochen alter Pflanzen von 9 gsmF-Linien. Die Kontrollen dienten Gesamt-RNA aus Pflanzen einer gsF- und einer mgfpF-Linie sowie aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Linien gsmF 151 und 154 sind für die T-DNA hemizygot (siehe 3.1). Von jeder Linie wurden 7,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit GUS-, SPT-, GFP- und AKTIN-Sonden hybridisiert.

Abb. 3 A) zeigt einen kolorimetrischen GUS-Aktivitätstest für 9 Pflanzen der Linie gsmF 106. Die X-Gluc Substratlösung zeigt in allen Fällen eine gleichmäßig kräftige Blaufärbung und damit stabil hohe Aktivität der β -Glucuronidase. Die Ergebnisse dieses kolorimetrischen GUS-Aktivitätstests stehen beispielhaft für alle gs- und gsm-Linien. Unabhängig von der Generation, in der sich die untersuchte Linie befand, wurde hohe Expression des GUS-Gens gefunden. Lediglich in wenigen Ausnahmefällen kam es in vergleichsweise alten, einzelnen Pflanzen zum Verlust der GUS-Aktivität. Dies wird unter 3.4.5 besprochen. In gleicher Weise stabil zeigte sich die GFP-Fluoreszenz in den gsm-Linien. Abb. 3 B) belegt dies exemplarisch, wiederum für die Linie gsmF 106. Die Expression des SPT-Gens wurde durch Auslegen entsprechender Samen auf Streptomycin-haltigem Agar-Medium nachgewiesen. Alle daraufhin untersuchten gs- oder gsm-Linien wiesen Resistenz gegen das Antibiotikum auf (Daten nicht gezeigt).

Um Unterschiede in der GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz zwischen einzelnen Linien genauer zu erfassen, wurden quantitative Tests durchgeführt. Anhand von 8 - 10 Pflanzen werden in diesen quantitativen Tests Mittelwerte der GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz innerhalb einer Linie, zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt. Ergebnisse solcher Tests sind in Abb. 3 C) zu sehen. Sowohl für das GUS- als auch das GFP-Gen zeigt sich deren Expression in unabhängigen Linien auf vergleichbaren Niveaus. Diese Ergebnisse stehen repräsentativ für eine Vielzahl quantitativer GUS-Aktivitäts- und GFP-Fluoreszenzmessungen anhand von gsm-Linien. Vergleichbare Werte für die GUS-Aktivität wurden auch in den gs-Linien ermittelt (Daten nicht gezeigt). Jede der gsm- und gs-Linien wurde mindestens zweimal in unabhängigen Untersuchungen im Alter von zwei, fünf und acht Wochen auf ihre GUS-Aktivität und/ oder GFP-Fluoreszenz hin überprüft. Es wurde in allen Fällen eine stabile und für die jeweiligen Reportergene vergleichbare Expression innerhalb unabhängiger Linien gefunden. Die Werte der GUS-Aktivität und/ oder GFP-Fluoreszenz, die in gs- und gsm-Linien ermittelt wurden, lagen auf dem gleichen Niveau wie Werte, die in Linien, die lediglich eines der Reportergene tragen, ermittelt wurden (Forsbach 2001, Schubert 2002).

Um in den gsm-Linien die Expression aller drei Reportergene zu erfassen, wurden Northern Blot-Experimente durchgeführt (Abb. 3 D). Für das GUS- und GFP-Gen bestätigten sich die Ergebnisse der quantitativen Tests (Abb. 3 C). Die unabhängigen, 8 Wochen alten Linien wiesen untereinander vergleichbare Mengen steady state mRNA für das GUS- und das GFP-Gen auf. Auch für das SPT-Gen zeigt der Vergleich der steady

state mRNA-Mengen in den unabhängigen Linien stabile, vergleichbare Expression in unabhängigen Linien.

Die Linien gsmF 151 und 154 (siehe 3.1) mit einem embryoletalen Phänotypen sind für die T-DNA hemizygot, tragen also nur die Hälfte der Reporter genkopien von, für die T-DNA homozygoten Linien. Die Linien gsmF 151 und 154 zeigen in Abb. 3 D) niedrigere steady state mRNA-Mengen für alle Reporter gene. In quantitativen Tests wiesen sie eine ca. 50 % niedrigere GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz auf (Daten nicht gezeigt).

Für die T-DNA homozygote gsm- und mgfp-Linien tragen je zwei Kopien des GFP-Gens. Wie beispielhaft anhand der Linie mgfpF 8 in Abb. 3 D) gezeigt, sind die mgfp steady state mRNA-Mengen in gsm- und mgfp-Linien vergleichbar groß. Die Linie gsF 100 zeigt steady state mRNA-Mengen des GUS- und SPT-Gens, die vergleichbar zu denjenigen in gsmF-Linien sind. Die Analyse zeigt, dass die verschiedenen Reporter gene sich nicht gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen.

Wie die Linie gsF 100 in Abb. 3 D), so zeigten auch alle weiteren gs-Linien in Northern Blot-Analysen stabile und vergleichbare steady state mRNA-Mengen für das GUS-Gen auf der einen und das SPT-Gen auf der anderen Seite (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der gewählten Wachstumsbedingungen auf die Expression der Reporter gene zu untersuchen, wurde die GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz zu drei verschiedenen Zeitpunkten, nach 2, 5 und 8 Wochen quantitativ erfasst. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die untersuchten Pflanzen zunächst in Sterilkultur auf Agar-Medium angezogen und im Alter von zwei Wochen in Erde überführt. In der Mehrzahl der Experimente zeigte sich ein charakteristisches Expressionsmuster, wie es in Abb. 4 dargestellt ist. Gezeigt sind quantitative Werte für GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz hemi- und homozygoter Vertreter unabhängiger gsm-Linien. Hemizygoten Pflanzen wurden durch Kreuzungen homozygoter Pflanzen mit *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen erzeugt. Die Expression der Reporter gene ist in allen Linien für 5 Wochen alte Pflanzen vergleichsweise gering und sowohl in 2, als auch 8 Wochen alten Pflanzen deutlich stärker. Es zeigen sich für GUS- und GFP-Gen gleiche zeitliche Muster der Expression. Dies gilt sowohl für hemi- als auch für homozygote Pflanzen. Offenbar unterliegen beide Reporter gene in ihrer Expression einer gleichgerichteten Beeinflussung. Die in Abb. 4 dargestellten Werte wurden dazu verwendet, um die Variabilität der quantitativen GUS- und GFP-Werte zu ermitteln. Die maximalen Unterschiede der gemessenen Gus-Aktivitäts- und GFP-Fluoreszenzwerte sind in der Tab. 3 zusammengefasst.

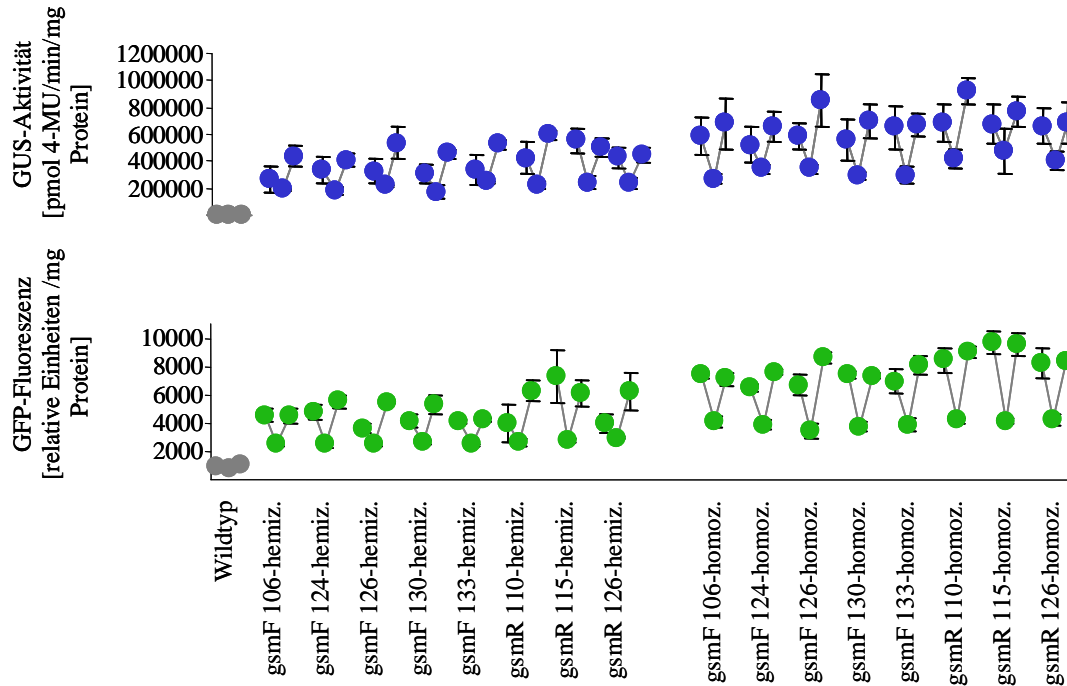


Abbildung 4: Variabilität der GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz in gsm-Linien im Verlauf der Entwicklung der Untersuchungspflanzen. Ergebnisse quantitativer GUS-Aktivitätstests (oben) und GFP-Fluoreszenzmessungen (unten) in 8 gsm-Linien. Von jeder Linie wurden für die T-DNA hemi- und homozygote Vertreter analysiert. Die Linien wurden im Alter von 2, 5 und 8 Wochen auf die Reporterexpression getestet. Die drei zu einer gsm-Linie gehörigen Messwerte sind durch eine Linie verbunden. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Tabelle 3
Variabilität der quantitativen GUS- und GFP-Werte in gsmF-Linien

	innerhalb einer Linie in Pflanzen unterschiedlichen Alters	zwischen zwei unabhängigen Linien in Pflanzen gleichen Alters	zwischen zwei unabhängigen Linien in Pflanzen unterschiedlichen Alters
GUS-Aktivität			
Hemizygoten Linien	2,7	2,0	3,5
Homozygote Linien	2,5	1,4	3,4
GFP-Fluoreszenz			
Hemizygoten Linien	2,6	2,0	2,9
Homozygote Linien	2,5	1,5	2,8

Die Werte wurden anhand der in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse quantitativer GUS-Aktivitätstests und GFP-Fluoreszenzmessungen berechnet.

Die geringsten Unterschiede der ermittelten Werte finden sich in unabhängigen Linien, die unter identischen Bedingungen gezogen und deren GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz zu einem Zeitpunkt erfasst wurden. Diese liegen zwischen 1,4- und 2,0-fach. Die erfassten Werte für die Expression der Reportergene innerhalb einer Linie für Pflanzen unterschiedlichen Alters (2, 5, 8 Wochen), weisen bereits Unterschiede von 2,5- bis 2,7-fach auf. Wird die Reportergenexpression in Pflanzen unabhängiger Linien und unterschiedlichen Alters verglichen, zeigen sich Unterschiede von 2,8- bis 3,5-fach.

Das beschriebene Muster der Reportergenexpression im Verlauf der Entwicklung von *A. thaliana* wurde nicht in allen durchgeführten Experimenten mit der in Abb. 4 dargestellten Deutlichkeit gefunden. Ausnahmen zeigten sich bei einzelnen Linien oder ganzen Testreihen. Trotz standardisierter Wachstumsbedingungen in einer Phytokammer scheinen weitere Faktoren für die Variabilität der Reportergenexpression verantwortlich zu sein.

Diese Ergebnisse belegen, dass nur Messungen der GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz die innerhalb eines Experimentes, mit unter gleichen Bedingungen gezogenen und gleichaltrigen Pflanzen ermittelt wurden, direkt miteinander vergleichbar sind. Dies wird beim Vergleich entsprechender Werte für die in Abb. 4 gezeigten hemi- bzw. homozygoten Linien klar. Fast alle nach 8 Wochen in hemizygoten Pflanzen gemessenen Werte der GUS-Aktivität und der GFP-Fluoreszenz liegen über den in 5 Wochen alten, homozygoten Pflanzen ermittelten Werten. Vergleicht man hingegen die jeweils in gleichaltrigen Vertretern gemessenen Werte für hemi- und homozygote Pflanzen, so ist ein positiver Gendosisseffekt zu erkennen.

Die Ausführungen bezüglich der Vergleichbarkeit von GUS-Aktivitäts- und GFP-Fluoreszenzmessungen hatten direkte Relevanz für die im Folgenden vorgestellte Analyse. Es wurde untersucht, ob sich die Orientierung der Reportergene auf der T-DNA auf die Expression auswirkt. In den Abb. 1 und 2 ist zu erkennen, dass die Reportergene in einer sogenannten „forward“ (F) oder „reverse“ (R) Orientierung auf der T-DNA vorliegen. F bezeichnet eine Orientierung der Reportergene bei der deren Transkription in Richtung der RB, R eine Orientierung der Reportergene bei der deren Transkription in Richtung der LB erfolgt.

Für die *gs*- und *gsm*-Linien lag eine große Zahl von quantitativen Messungen der GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz vor. Waren in einem Experiment unter gleichen Bedingungen gewachsene, gleichaltrige Pflanzen analysiert worden, deren T-DNAs sich lediglich in der Orientierung der Reportergene unterschieden, dann konnten die GUS-Aktivitäts- und GFP-Fluoreszenzwerte der in F- bzw. R-Orientierung vorliegenden

Reportergene verglichen werden. Es wurde ein Mittelwert der jeweiligen Werte in Linien mit einer R- ($\emptyset R$) und ein Mittelwert der jeweiligen Werte in Linien mit einer F-Orientierung der Reportergene ($\emptyset F$) gebildet. Hieraus wurde der Quotient $\emptyset R/\emptyset F$ errechnet. Dieser Quotient erlaubt es, in unabhängigen Experimenten, zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelte Werte miteinander zu vergleichen.

Die in einem Experiment verglichenen Linien mit R- oder F-Orientierung der Reportergene betrug zwischen 1/1 und 3/5 für die gsm- bzw. 2/1 und 4/6 für die gs-Linien. Insgesamt wurden 10 gs-Linien (6 gsF-, 4 gsR-Linien) und 14 gsm-Linien (7 gsmF-Linien, 7 gsmR-Linien) für die Analyse verwendet. Die Abb. 5 stellt die Ergebnisse dieser Analyse dar.

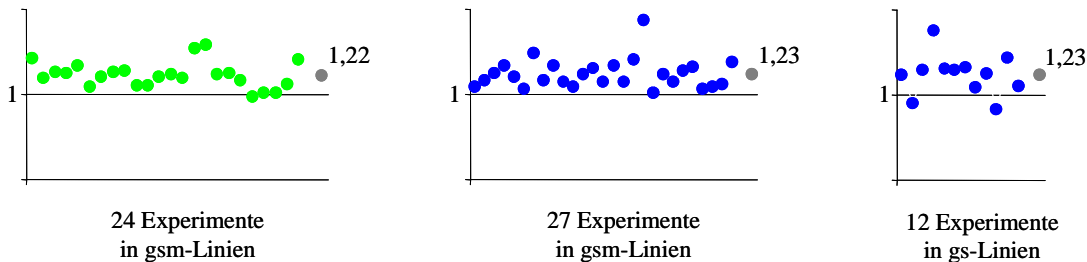


Abbildung 5: $\emptyset R/\emptyset F$ Quotient der quantitativen Werte der GUS-Aktivität bzw. GFP-Fluoreszenz in gs- und gsm-Linien. Zur Durchführung der Analyse siehe auch im fortlaufenden Text. Jeder Messpunkt stellt das Verhältnis der in einem Experiment ermittelten durchschnittlichen Werte der GUS-Aktivität bzw. GFP-Fluoreszenz für Linien mit R- und F-Orientierung der Reportergene dar. Zusätzlich ist jeweils ein aus allen Quotienten errechneter Mittelwert gezeigt. Die Analyse wurde für die GUS-Aktivitäten in gs-Linien und für die Werte der GUS-Aktivität bzw. GFP-Fluoreszenz in gsm-Linien durchgeführt. Blaue Punkte markieren Quotienten, die aus GUS-Aktivitätswerten berechnet wurden, grüne Punkte markieren Quotienten, die aus Werten für die GFP-Fluoreszenz ermittelt wurden.

Nahezu alle ermittelten $\emptyset R/\emptyset F$ Quotienten, sei es für die Werte der GUS-Aktivität oder der GFP-Fluoreszenz in gsmR- bzw. gsmF-Linien, oder für die Werte der GUS-Aktivität in gsR- bzw. gsF-Linien sind größer eins. Dies bedeutet, dass die mittleren Werte der GUS-Aktivität und GFP-Fluoreszenz, die in Linien mit R-Orientierung der Reportergene gemessen werden größer sind als diejenigen, die in Linien mit F-Orientierung der Reportergene gemessen werden. Errechnet man den Durchschnitt aller $\emptyset R/\emptyset F$ Quotienten so ergibt sich für die GUS-Aktivitäten in gs-Linien ein Wert von 1,23, für die GUS-Aktivitäten in gsm-Linien ein Wert von 1,23 und für die GFP-Fluoreszenz in gsm-Linien ein Wert von 1,22. Die Expression der Reportergene in Linien mit einer R-Orientierung der Reportergene liegt somit um ca. 20 bis 25 % über derjenigen in Linien mit einer F-

Orientierung der Reportergene, obwohl die T-DNAs beider Linien bis auf die Orientierung der Reportergene identisch sind.

3.2.2 Vergleich der steady state mRNA-Mengen des SPT- und GUS-Gens

Alle Reportergene werden vom teilweise transkribierten *ocs3'*-Ende gefolgt (Abb. 1 und 2). Wird die Membran eines Northern Blot-Experiments mit einer OCS-Sonde hybridisiert, können die Reportergentranskripte sichtbar gemacht werden. Die Hybridisierung mit einer OCS-Sonde ermöglicht einen direkten Vergleich der steady state mRNA-Mengen des GUS- und SPT-Gens in *gs*-Linien. Dies ist in Abb. 6 dargestellt.

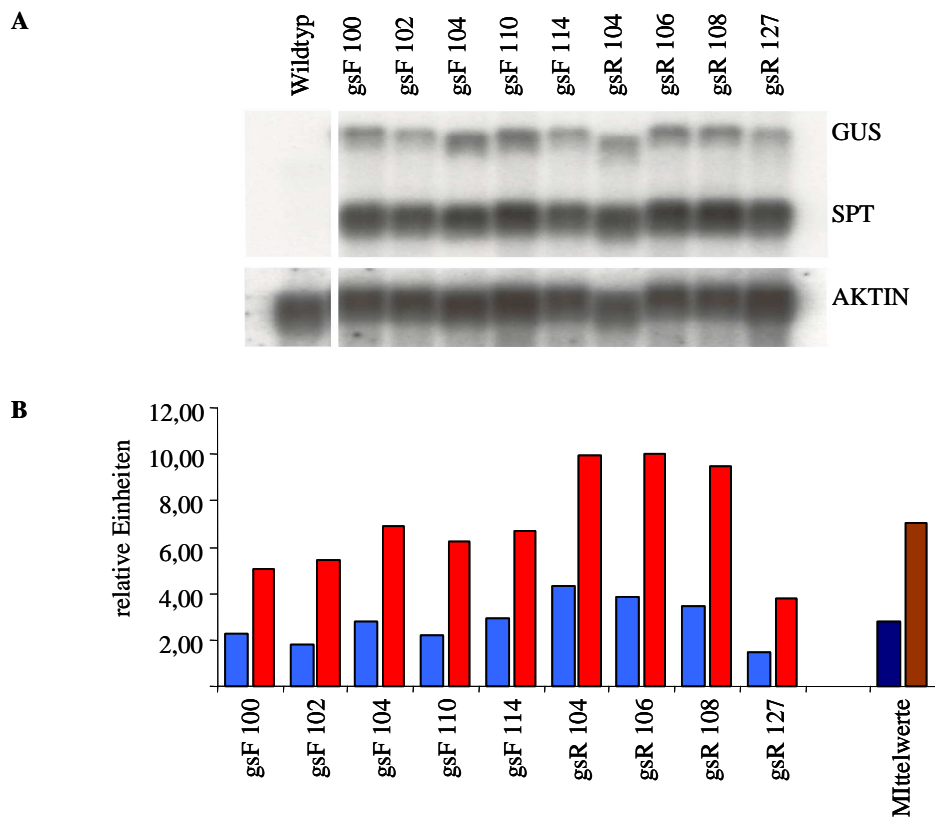


Abbildung 6: Verhältnis der steady state mRNA-Mengen des GUS- und SPT-Gens in *gs*-Linien. **A)** Northern Blot-Analyse zur Ermittlung des Verhältnisses der SPT- zu GUS- steady state mRNA-Mengen anhand 8 Wochen alter Pflanzen 9 unabhängiger *gs*-Linien. Es wurden jeweils 7,5 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Als Kontrolle diente *A. thaliana* Wildtyp-Gesamt-RNA. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit OCS- und AKTIN- Sonden hybridisiert.

B) Die Signalstärken der in A) aufleuchtenden Fragmente wurde mit Hilfe eines Phospho-Imagers quantitativ ausgewertet. Die gemessenen Intensitäten für das GUS- (blau) bzw. SPT- (rot) Fragment wurden durch die, für das Aktin-Fragment ermittelten Intensitäten dividiert. Der größte so ermittelte Faktor wurde auf 10 gesetzt. Zusätzlich ist jeweils ein Mittelwert der Quotienten gezeigt.

Die aufeinanderfolgenden Hybridisierungen mit einer OCS- und AKTIN-Sonde einer Membranen, die aufgetrennte Gesamt-RNA aus gs-Linien trug, wurden quantitativ anhand eines Phospho-Imagers ausgewertet. Wie in Abb. 6 zu erkennen ist, zeigen sich für das SPT-Gen größere Mengen steady state mRNA Mengen als für das GUS-Gen. Im Schnitt liegen die Mengen der SPT-Transkripte um 2,5-fach über denen der GUS-Transkripte. Eine vergleichbare Analyse der gsm-Linien war nicht möglich, da SPT- und GFP-mRNA aufgrund ihrer sehr ähnlichen Größe gelelektrophoretisch nicht ausreichend voneinander getrennt werden können.

3.3 Expression des GUS-Reportergens unter Kontrolle des pnos-Promotors in *A. thaliana*

3.3.1 Variabilität in der Expression des GUS-Reportergens zwischen unabhängigen *A. thaliana* pg-Linien

Die Ergebnisse, die für die Transgenexpression unter dem vergleichsweise starken CaMV 35S-Promotor gewonnen wurden, sollten der Expressionsanalyse eines Reportergens unter der Kontrolle eines vergleichsweise schwachen Promotors gegenübergestellt werden. Hierzu wurde der pnos-Promotor gewählt.

Die im folgenden untersuchten pg-Linien tragen in ihren T-DNAs eine, zwei oder drei Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des pnos-Promotors (Abb. 1). Liegen zwei oder drei Kopien vor, so sind diese in Tandem organisiert. Es wurden fünf pgR-, sechs pg2R- und fünf pg3R-Linien analysiert. Abb. 7 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen quantitativen GUS-Tests diverser pg-Linien anhand zwei Wochen alter Pflanzen. Die ermittelten GUS-Aktivitätswerte liegen zwischen 228 (pgR 122) und 5306 (pgR 111) [pmol 4-MU/min/mg Protein]. Dies entspricht einem ca. 23-fachen Unterschied. Diese Unterschiede sind deutlich größer als die, die in Linien die ein GUS-Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors tragen, beobachtet wurden (Tab. 3). Die Linie pgR 111 weist die höchste GUS-Aktivität auf. Diese ist höher als diejenige von pg2R-Linien mit der doppelten, oder von pg3R-Linien mit der dreifachen Anzahl des GUS-Reportergens. Die Linie mit der geringsten GUS-Aktivität ist die Linie pgR 122, eine Linie mit der gleichen Kopienzahl des GUS-Reportergens wie die Linie pgR 111. Somit zeigt sich weder ein positiver noch ein negativer Gendosiseffekt wie beim GUS-Gen unter

Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (Lechtenberg 1999, Gils 2000, Forsbach 2001, Schubert 2002).

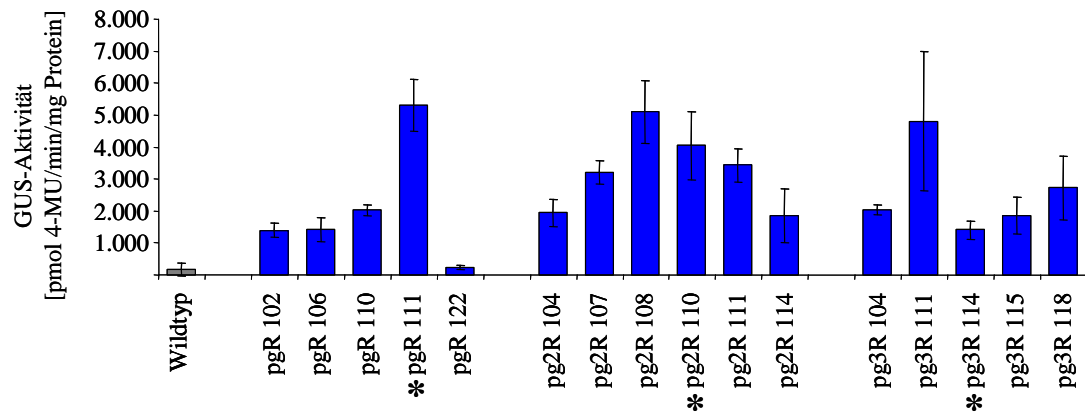


Abbildung 7: Ergebnis quantitativer GUS-Tests zwei Wochen alter Pflanzen von pgR-, pg2R- und pg3R-Linien. Als Kontrollen wurden *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die mit * markierten Linien wurde für die in Abb. 8 gezeigte Analyse eingesetzt.

Die in pg-Linien ermittelten GUS-Aktivitäten hatten in der Regel die niedrigsten Werte in 5 Wochen alten Pflanzen. In 2 und 8 Wochen alten Pflanzen zeigten sich höhere GUS-Aktivitäten. Damit besitzen auch pg-Linien das charakteristische Muster der Expression des GUS-Gens innerhalb ihrer Entwicklung, welches auch für unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehende Reportergene gezeigt wurde (Abb. 4). Unter Kontrolle des pnos-Promotors stehende GUS-Gene weisen eine durchschnittlich 300-fach geringere Expression auf, als solche unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors.

Um zu testen, ob die ermittelten GUS-Aktivitäten spezifisch für einzelne Linien sind, wurden in einem weiteren Experiment für drei ausgewählte pg-Linien mehrere Geschwisterlinien aus unterschiedlichen Generationen auf ihre GUS-Aktivität hin untersucht. Abb. 8 zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Es ist zu erkennen, dass alle Vertreter der Linie pgR 111 vergleichsweise hohe, alle Vertreter der Linie pg3R 114 vergleichsweise niedrige GUS-Aktivitäten aufwiesen. Die GUS-Aktivitäten innerhalb der Vertreter der Linie pg2R 110 lag zwischen denen der anderen beiden Linien. Dies entspricht den in Abb. 7 für Vertreter dieser Linien dargestellten Verhältnissen. Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests zeigten ebenfalls die unterschiedlich starke Aktivität des GUS-Gens in den Linien pgR 111, pg2R 110 und pg3R 114 (Daten nicht gezeigt). Somit weisen unabhängige pg-Linien spezifische GUS-Aktivitäten auf.

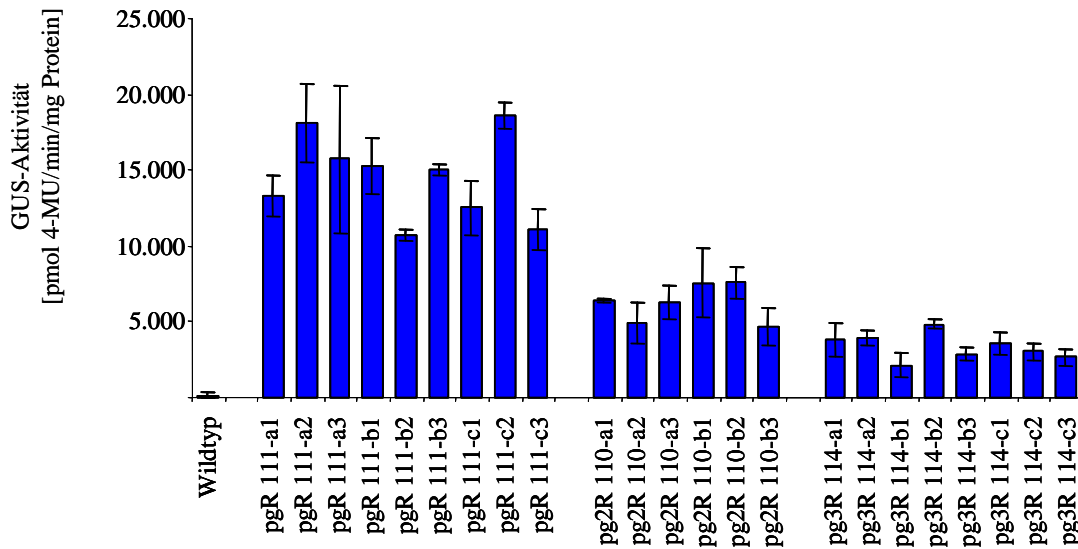


Abbildung 8: Ergebnisse quantitativer GUS-Tests zahlreicher Geschwisterlinien der Linien pgR 111, pg2R 110 und pg3R 114. Ergebnisse quantitativer GUS-Tests zwei Wochen alter Pflanzen verschiedener Vertreter der Linien pgR 111, pg2R 110 und pg3R 114. Von jeder Linie wurden zwei bis drei aufeinander folgende Generationen und innerhalb jeder Generation zwei bis drei Geschwisterlinien analysiert. Die dem Liniennamen folgenden Buchstaben stehen für aufeinander folgende Generationen (a = T2, b = T3, c = T4), die Zahlen für unterschiedliche Geschwisterlinien. Als Kontrolle dienten *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. GUS-Aktivitätswerte für Vertreter dieser Linien sind ebenfalls in Abb. 7 dargestellt.

3.4 Inaktivierung der Reportergene in *A. thaliana*

3.4.1 Inaktivierung der Reportergene in *A. thaliana* Linien, die drei oder mehr GUS-Reportergene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors tragen

Werden drei oder mehr Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in einer Pflanze exprimiert kommt es zur Inaktivierung dieses Reportergens (Schubert 2002). So z. B. in für die T-DNA hemizygoten g3R- oder g3F-Linien, die drei GUS-Gene in Tandem innerhalb ihrer T-DNA tragen (Schubert 2002). Für die T-DNA hemizygoten g2F- und g2R-Linien, die lediglich zwei GUS-Gene in Tandem innerhalb ihrer T-DNA tragen, zeigen demgegenüber stabile Expression des Gus-Gens ebenso wie Linien die lediglich ein GUS-Gen in ihrer T-DNA tragen und für die T-DNA homozygot sind (g1xF- und g1xR- Linien, Schubert 2002). Promotorlose GUS-Gene (Δ 35g-Linien) hatten keinen Einfluss auf die Expression von GUS-Genen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (Forsbach 2001, Schubert 2002).

Von Schubert (2002) wurden auch Experimente durchgeführt, in denen die Expression des SPT-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors untersucht wurde. Linien, die insgesamt 9 oder 12 Kopien des SPT-Gens tragen, zeigen demnach Silencing dieses Reportergens (s3f 118/147-Linien, Schubert 2002), wohingegen für Linien, die insgesamt 2 oder 6 Kopien des SPT-Gens tragen keine Inaktivierung des SPT-Gens nachgewiesen werden konnte (s3F- und sF-Linien, Schubert 2002). Sowohl für das Silencing des GUS- als auch des SPT-Gens wurde der Nachweis einer posttranskriptionellen Inaktivierung erbracht (Schubert 2002).

Auch in homozygoten gsg-Linien, die 4 Kopien des GUS-Gens tragen, kommt es zur Inaktivierung des GUS-Gens (Lechtenberg 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Inaktivierung des GUS-Gens in gsg-Linien auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruht und wie sich die Inaktivierung des GUS-Gens auf die Expression des SPT-Gens auswirkt. Die Inaktivierung des GUS-Gens innerhalb der gsg-Linien wird in jeder Generation erneut etabliert und setzt bei verschiedenen Pflanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein. Dies führt zu Variabilität der GUS-Aktivität innerhalb einer Population genetisch identischer Pflanzen. Exemplarisch ist dies in Abb. 9 gezeigt. Das Silencing des GUS-Gens weist in den drei exemplarisch dargestellten Linien unterschiedliche Geschwindigkeit und Ausprägung auf. Während nahezu alle Vertreter der Linie gsgF 136 nach 5 Wochen noch hohe GUS-Aktivität zeigen, haben alle Vertreter der Linie gsgF 125 bereits ihre GUS-Aktivität verloren. Nach 8 Wochen ist auch in allen Vertretern der Linie gsgF 136 das GUS-Gen inaktiviert. Demgegenüber stehen die Vertreter der Linie gsgR 129. Zwar zeigt sich hier bereits in 2 Wochen alten Pflanzen eine Erniedrigung der GUS-Aktivität, einzelne Pflanzen besitzen aber selbst nach 8 Wochen noch hohe GUS-Aktivität. Auch innerhalb einzelner Pflanzen ist Variabilität der GUS-Aktivität zu finden, wie die markierten Beispiele in Abb. 9 zeigen. Die in quantitativen GUS-Tests ermittelten Werte für gsg-Linien können sich bis zu 1000-fach unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Dies unterstreicht ebenfalls die große Variabilität der GUS-Aktivität innerhalb dieser Linien. Die gefundene Variabilität, hervorgerufen durch das im Verlauf der Entwicklung etablierte Silencing, deutet auf einen posttranskriptionellen Mechanismus hin.

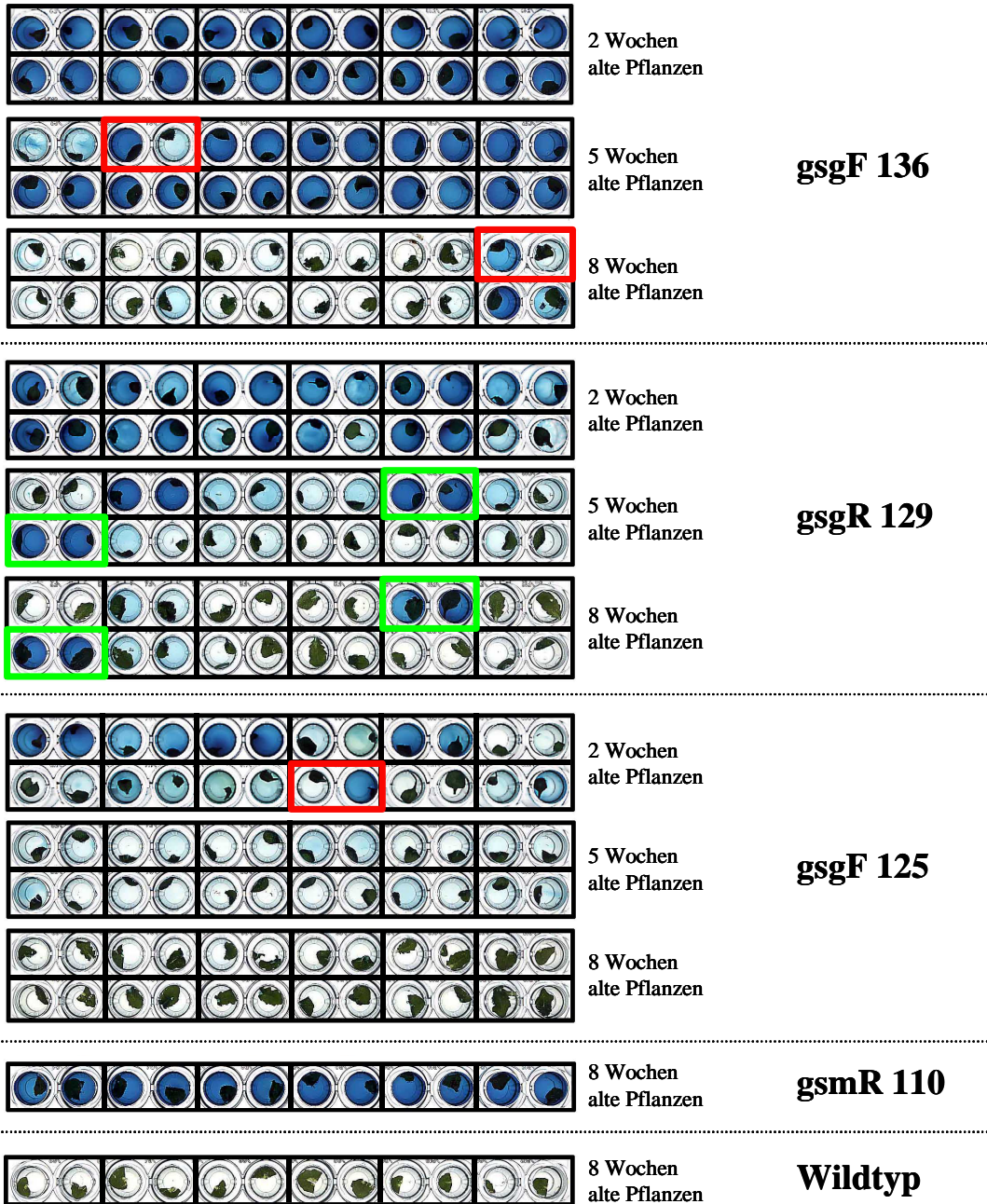


Abbildung 9: Variabilität der GUS-Aktivität in genetisch identischen Pflanzen. Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests für je zwölf 2, 5 und 8 Wochen alte Vertreter der Linien gsgF 136, gsgR 129 und gsgF 125. Die nach 5 und 8 Wochen analysierten Pflanzen waren identisch. Pro Pflanze wurden zwei kleine Rosettenblätter für den Test verwendet. Als Kontrollen dienten Pflanzen der Linie gsmR 110 und *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Grün umrandet: Pflanzen ohne Verlust der GUS-Aktivität nach 5 und 8 Wochen. Rot umrandet: deutliche GUS-Aktivitätsunterschiede in zwei Blättern einer Pflanze.

Wie unter 3.2.2 bereits erläutert, bietet die Tatsache, dass alle Reportergene vom teilweise transkribierten *ocs3'*-Ende gefolgt werden, die Möglichkeit SPT- und GUS-Transkriptmengen in Northern Blot-Experimenten direkt miteinander zu vergleichen. In Abb. 10 ist ein Northern Blot-Experiment für die *gsg*-Linien dargestellt, bei dem Sequenzen des *ocs3'*-Endes als Sonde zur Hybridisierung verwendet wurden.

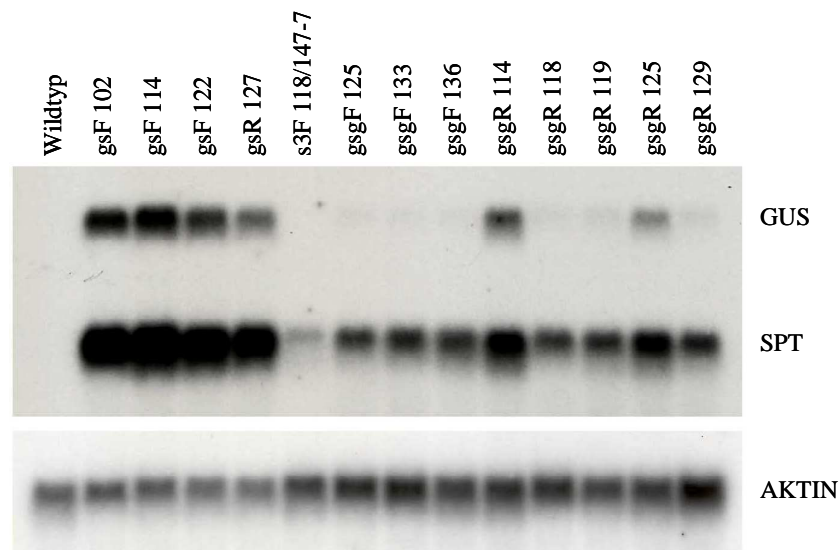


Abbildung 10: Inaktivierung des GUS- und SPT-Gens in *gsg*-Linien. Northern Blot-Analyse 8 Wochen alter Pflanzen von 8 *gsg*-Linien. Als Kontrollen diente Gesamt-RNA aus Pflanzen von vier *gs*-Linien, der Linie s3F 118/147-7 sowie aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Linie s3F 118/147-7 trägt insgesamt 12 Kopien des SPT-Gens und zeigt posttranskriptionelle Inaktivierung dieses Reportergens (Schubert 2002). Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit OCS- und AKTIN-Sonden hybridisiert.

Bis auf die Linien *gsgR* 114 und 125 zeigen alle weiteren Linien zum Teil stark reduzierte steady state GUS-mRNA-Mengen. Dies geht einher mit ebenfalls reduzierten steady state mRNA-Mengen des SPT-Gens. Offensichtlich unterliegt in *gsg*-Linien auch das SPT-Gen einer Inaktivierung. Homozygote *gsg*-Linien tragen 2 Kopien des SPT-Gens. Wie eingangs erwähnt, war in vorhergehenden Untersuchungen Silencing des SPT-Gens erst bei gleichzeitiger Expression von 9 Kopien nachgewiesen worden (Schubert 2002). Die Inaktivierung des SPT-Gens scheint somit eine Folge des Silencings des GUS-Gens zu sein.

Die Northern Blot-Analyse zeigt, dass die steady state mRNA-Mengen der beiden Reportergene in Beziehung zueinander stehen. *Gsg*-Linien, die relativ große Mengen steady state GUS-mRNA aufweisen, besitzen auch vergleichsweise viel steady state SPT-mRNA. So z. B. die Linien *gsgR* 114 und 125.

Kleine, 21 – 25 nt lange, sogenannte „small interfering RNAs“ (siRNAs) sind spezifisch für RNA-Silencing (Hamilton und Baulcombe 1999). Um den Mechanismus des Silencing in *gsg*-Linien zu untersuchen, wurden Experimente zum Nachweis von siRNAs für die kodierenden Sequenzen des GUS- oder SPT-Gens sowie für den transkribierten Bereich des *ocs3'*-Endes unternommen. Wie in Abb. 11 zu erkennen ist, konnten siRNAs spezifisch für die kodierende Sequenz des GUS-Gens und des transkribierten Bereichs des *ocs3'*-Endes, nicht aber für die kodierende Sequenz des SPT-Gens nachgewiesen werden.

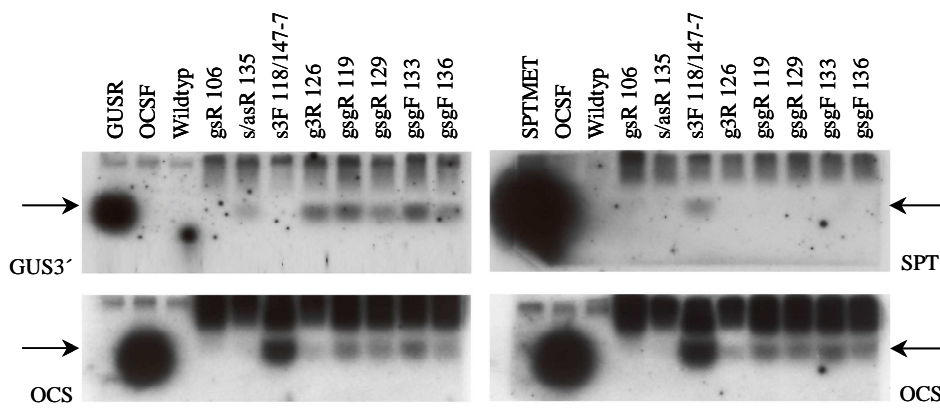


Abbildung 11: Experimente zum Nachweis von GUS- und SPT-siRNAs in *gsg*-Linien. Die für die Untersuchung verwendeten Pflanzen waren 8 Wochen alt. Das verwendete Blattmaterial stammte von denselben Pflanzen, die auch das Blattmaterial für die Abb. 10 gezeigte Northern Blot-Analyse lieferten und wurde zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Als Größenstandards dienten 75 ng der GUSR, SPTMET bzw. OCSF Oligonukleotide, gemischt mit 25 - 40 µg Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Als Kontrollen diente Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen, aus Pflanzen einer *gsR*-, einer *s/as*- (Forsbach 2001), einer *g3R*-Linie und der Linie *s3F 118/147-7* (Schubert 2002). *S/as*-Linien tragen eine Kopie des GUS-Gens in *sense*, und eine Kopie des GUS-Gens in *antisense* Orientierung in ihrer T-DNA und zeigen Silencing des GUS-Gens (Forsbach 2001). Eine Gesamt-RNA-Präparation wurde geteilt und für zwei Experimente zum Nachweis von siRNAs eingesetzt (je 25 - 40 µg). Beide Membranen wurden zuerst mit einer OCS3'-Sonde hybridisiert (untere Abbildungen), eine Membran wurde anschließend mit einer GUS3'-Sonde (links oben), die andere mit einer SPT-Sonde hybridisiert (rechts oben). Die Signale der siRNAs sind durch einen Pfeil markiert. Die oberhalb aufleuchtenden Signale sind unspezifisch.

Für die gezeigten vier *gsg*-Linien, die Linie *g3R 126* und die Linie *s/as 135* wurde durch gleichzeitig durchgeführte kolorimetrische GUS-Aktivitätstests Silencing des GUS-Gens nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das verwendete Blattmaterial stammte von denselben Pflanzen, die auch das Blattmaterial für die in Abb. 10 dargestellte Northern Blot-Analyse lieferten. Dort wurden für die vier *gsg*-Linien sehr niedrige steady state mRNA-Mengen des GUS-Gens und reduzierte steady state mRNA-Mengen des SPT-Gens gefunden.

Alle vier *gsg*-Linien, die *s/as*-Linie und die *g3R*-Linie zeigen in der Hybridisierung mit einer GUS3'-Sonde siRNAs. Die Inaktivierung des GUS-Gens in den *gsg*-Linien erfolgt somit auf posttranskriptionellem Wege.

In der Hybridisierung mit einer GUS3'-Sonde zeigt die Linie g3R 126 eine zu den gsg-Linien vergleichbare Menge siRNAs für die kodierende Sequenz des GUS-Gens (Abb. 11). Interessanterweise sind in der Hybridisierung derselben Membran mit einer ocs3'-Sonde für die gsg-Linien deutlich größere Mengen siRNAs für den transkribierten Bereich des ocs3'-Endes im Vergleich zur Linie g3R 126 zu erkennen. Dies könnte im Zusammenhang mit der Inaktivierung des SPT-Gens stehen.

Für die kodierende Sequenz des SPT-Gens konnten durch Hybridisierung mit einer SPT-Sonde keine siRNAs in den gsg-Linien nachgewiesen werden (Abb. 11). Dies könnte spezifisch, aber auch ein Problem des Nachweises sein.

Die Linie s/as 135, die ein GUS-Gen sowohl in *sense* als auch in *antisense* Orientierung trägt (Forsbach 2001), zeigt ebenfalls in der Hybridisierung mit einer GUS-Sonde siRNAs. In der Hybridisierung mit einer ocs3'-Sonde konnten für die Linie s/as 135 keine siRNAs nachgewiesen werden (Abb. 11).

In gsg-Linien befinden sich GUS- und SPT-Gen innerhalb einer T-DNA an einem Locus. Um das Verhalten zweier Reportergene, von denen eines der Inaktivierung unterliegt, an zwei unabhängigen Loci zu untersuchen, wurden Kreuzungen anhand von Linien durchgeführt, die drei Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors auf ihrer T-DNA tragen (g3R-Linien, Schubert 2002). G3R-Linien zeigen bereits im für die T-DNA hemizygoten Zustand Silencing des GUS-Gens. Gekreuzt wurden sie einerseits mit mgfp-Linien, andererseits mit Linien, die drei Kopien des SPT-Gens in ihrer T-DNA tragen (s3F-Linien, Schubert 2002). Alle Analysen wurden anhand der F1-Nachkommen dieser Kreuzungen durchgeführt.

Unter Verwendung eines Fluoreszenzstereomikroskops konnte frühzeitiger Verlust der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, ein kolorimetrischer GUS-Aktivitätstest belegte die Inaktivierung des GUS-Gens (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt und Experimente zum Nachweis von siRNAs unternommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt. In der Northern Blot-Analyse zeigt die Hybridisierung mit einer GUS-Sonde, dass die Kreuzungsnachkommen, die 3 Kopien des GUS-Gens tragen, von Silencing dieses Reportergens betroffen sind. Die Hybridisierungen mit SPT- und GFP-Sonden zeigen, dass diese beiden Reportergene in diesen Kreuzungsnachkommen ebenfalls inaktiviert werden. In Pflanzen, die von Silencing des SPT-Gens betroffen sind, leuchtet bei der Hybridisierung mit einer SPT-Sonde ein zweites, verkürztes SPT-Transkript auf. Dieses wurde nicht immer, aber ausschließlich in Linien, die Silencing des SPT-Gens aufwiesen gefunden (Schubert 2002).

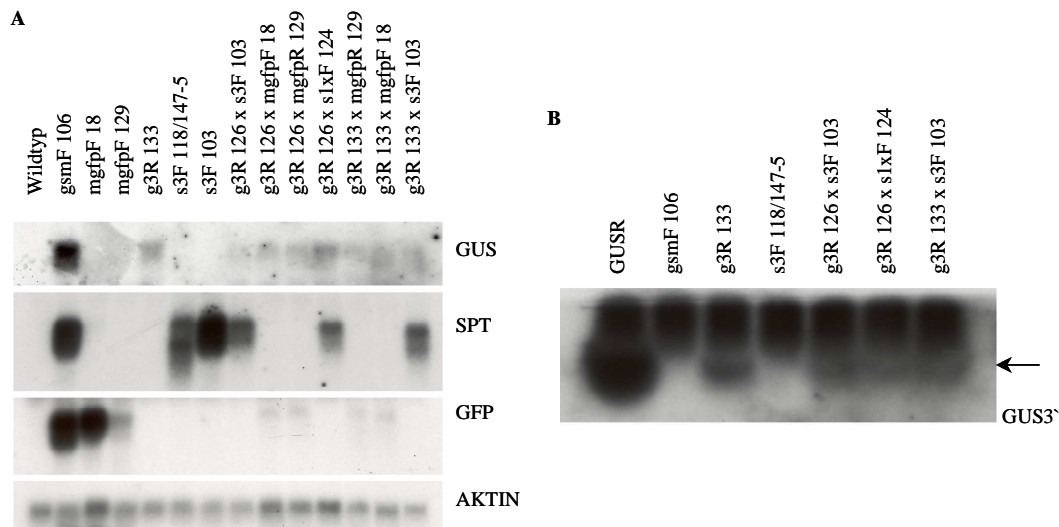


Abbildung 12: Inaktivierung des GUS-, SPT- und GFP-Gens in Nachkommen aus Kreuzungen von g3R-Linien mit s3F-, mgfp- und s1xF-Linien. **A)** Northern Blot-Analyse anhand 6 Wochen alter Nachkommen von Kreuzungen von g3R-Linien mit s3F-, mgfp- und s1xF-Linien. Als Kontrollen dienten Gesamt-RNAs zweier mgfpF-Linien, einer gsmF-, einer g3R-, einer s3F-Linie, der Linie s3F 118/147-5 sowie aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Linien s3F 118/147-5, mgfpF 129 und g3R 133 zeigen Silencing für das SPT-, GFP- bzw. GUS-Reporter-gen. Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit GUS-, SPT-, GFP- und AKTIN-Sonden hybridisiert. **B)** Experiment zum Nachweis von GUS-siRNAs in Nachkommen von Kreuzungen von g3R-Linien mit s3F- und s1xF-Linien. Das verwendete Blattmaterial stammte von denselben Pflanzen, die auch das Blattmaterial für die in A) gezeigte Northern Blot-Analyse lieferten und wurde zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Als Größenstandards dienten 75 ng des GUSR Oligonukleotids, gemischt mit 50 - 75 µg Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Als Kontrollen dienten Gesamt-RNAs aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen sowie aus einer gsmF-, einer g3R-Linie sowie der Linie s3F 118/147-5 (s.o.). Es wurde jeweils eine komplette Gesamt-RNA-Präparation eingesetzt (50 - 75 µg). Die Membran wurde mit einer GUS3'-Sonde hybridisiert. Die Signale der siRNAs sind durch einen Pfeil markiert. Die oberhalb aufleuchtenden Signale sind unspezifisch.

In den Kreuzungsnachkommen konnten nur siRNAs der kodierenden Sequenz des GUS-Gens nachgewiesen werden (Abb. 12 B). Es konnten weder siRNAs für die kodierende Sequenz des SPT-Gens noch des GFP-Gens detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Fehlende Korrelation zwischen der steady state mRNA-Menge des GUS-Reportergens und der Proteinaktivität der β -Glucuronidase in Linien, die von Inaktivierung des GUS-Gens betroffen sind

Die in von Silencing betroffenen gsg-Linien verbleibende Aktivität des GUS-Gens befindet sich in der gleichen Größenordnung wie diejenige, die in pg-Linien nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt). Um zu prüfen, ob dies mit vergleichbaren Mengen GUS steady

state mRNA einhergeht, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Für gsg-Linien, deren GUS-Gen von Silencing betroffen war, konnten geringe Mengen GUS steady state mRNA nachgewiesen werden (Abb. 10). Für pg-Linien gelang dies erst nach Präparation von Gesamt-mRNA aus Individuen der Linie pgR 111, welche unter den pg-Linien die höchste GUS-Aktivität aufweist (Abb. 7) und Überexposition im Verlauf der Autoradiographie (Abb. 13). Für die drei RNA-Präparationen aus Pflanzen der Linie pg3R 114 ist keine Hybridisierung mit der GUS-Sonde zu erkennen (Abb. 13). Diese Linie weist innerhalb der pg-Linien eine vergleichsweise geringe GUS-Aktivität auf (Abb. 7). In den übrigen Linien, deren GUS-Gene unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehen und von Silencing betroffen sind, zeigen sich deutlich größere Mengen GUS steady state mRNA.

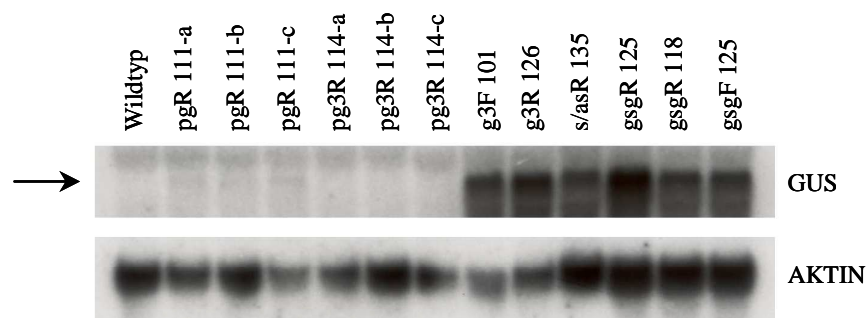


Abbildung 13: Vergleich der steady state mRNA-Mengen in pg-Linien und vom Silencing des GUS-Gens betroffenen Linien, deren GUS-Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehen. Northern Blot-Analyse anhand 8 Wochen alter Pflanzen verschiedener Linien, die Silencing des GUS-Gens zeigen, sowie der Linien pgR 111 und pg3R 114. Die Linie g3F 101 trägt insgesamt 6 Kopien des GUS-Gens, ebenso wie die Linie g3R 126 (Schubert 2002). Die Linie s/as 135 trägt zwei Kopien des GUS-Gens, eine in *sense*, eine in *antisense* Orientierung in ihrer T-DNA (Forsbach 2001). Als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Es wurden jeweils 15 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit GUS- und AKTIN-Sonden hybridisiert.

Bei vergleichbaren GUS-Proteinaktivitäten (Daten nicht gezeigt) weisen Linien, deren GUS-Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehen und die vom Silencing dieses Reportergens betroffen sind, deutliche größere Mengen steady state GUS-mRNA auf, als nicht von Silencing betroffene pg-Linien deren GUS-Gen unter Kontrolle eines schwachen Promotors steht. Es besteht in den von Silencing betroffenen Linien folglich keine Korrelation zwischen den steady state mRNA-Mengen des GUS-Gens und den resultierenden Proteinaktivitäten.

3.4.3 Expression der Reportergene in Kreuzungsnachkommen, die zusätzlich eine *antisense* Kopie des GUS-Reportergens exprimieren

In vorangegangenen Studien war gezeigt worden, dass die gleichzeitige Expression einer GUS *sense* und *antisense* Gensequenz, beide unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, sehr effektiv zum Silencing des GUS-Gens führt (Forsbach 2001). Dieses Silencing beruht auf einem posttranskriptionellen Mechanismus, wie der Nachweis Gus-Gen-spezifischer siRNAs für die Linie *s/as* 135 in Abb. 11 zeigt. Wie sich das Vorhandensein von *antisense* Gus-Transgenen auf gleichzeitig anwesende SPT- und GFP-Reportergene auswirkt, wurde anhand entsprechender Kreuzungen zwischen *as*- bzw. *s/as*-Linien sowie *gs*-, *gsm*-, *gsg*- und *mgfp*-Linien im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

In kolorimetrischen und quantitativen GUS-Aktivitätstests anhand zwei Wochen alter Pflanzen bestätigte sich die effektive Inaktivierung einer GUS *sense* Kopie bei gleichzeitiger Anwesenheit einer GUS *antisense* Kopie (Daten nicht gezeigt). Für Kreuzungsnachkommen, die ein GFP-Gen trugen, wurden quantitative GFP-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Abb. 14 stellt die Ergebnisse dar. Es ist zu erkennen, dass Linien, die eine GUS *sense* und *antisense* Kopie tragen, GFP-Fluoreszenzwerte auf Wildtyp-Niveau aufweisen. Offensichtlich ist das GFP-Gen in diesen Linien inaktiviert. So z. B. in den Kreuzungen von *gsm*- mit *as*- oder *s/as*-Linien und den Kreuzungen von *mgfp*- mit *s/as*-Linien. Nachkommen von Kreuzungen von *mgfp*- mit *as*-Linien zeigen demgegenüber Werte für die GFP-Fluoreszenz, die denjenigen entsprechen, die in Linien ermittelt wurden, die für die *gsm*-T-DNAs ebenfalls hemizygot waren (Abb. 4). In den Nachkommen aus Kreuzungen von *mgfp*- mit *as*-Linien kommt es also nicht zu einer Inaktivierung des GFP-Gens. Die Nachkommen der Kreuzung einer *gsm*- mit einer *mgfp*- Linie tragen zwei Kopien des GFP-Gens und zeigen im Vergleich zu den Nachkommen von Kreuzungen von *mgfp*- mit *as*-Linien etwa doppelt so hohe Werte für die GFP-Fluoreszenz.

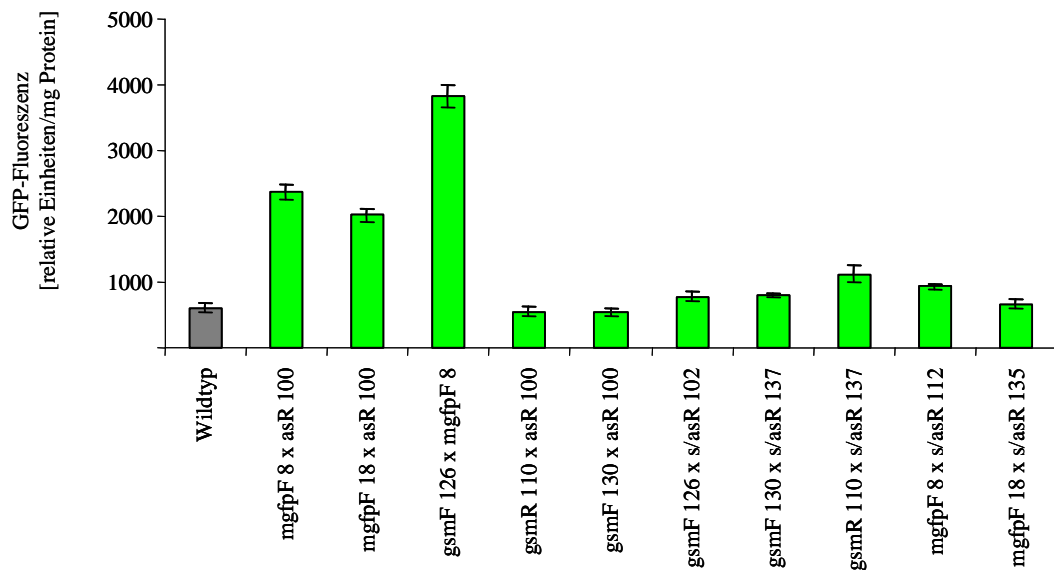


Abbildung 14: Inaktivierung des GFP-Gens in Nachkommen aus Kreuzungen von *gsm*- und *mgfp*-Linien mit *as*- und *s/as* Linien. Ergebnisse quantitativer GFP-Fluoreszenzmessungen 8 Wochen alter Pflanzen. Als Kontrolle dienten Nachkommen einer Kreuzung einer *gsm*- und einer *mgfp*-Linie sowie *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Abb. 15 zeigt die auf Streptomycin-haltigem Agar-Medium zur Keimung gebrachten Nachkommen von Kreuzungen von *gs*-, *gsm*- und *gsg*-Linien mit *as*-Linien bzw. *gs*- und *gsm*-Linien mit *s/as*-Linien. Es ist zu erkennen, dass in diesen Kreuzungsnachkommen das SPT-Gen einer Inaktivierung unterliegt. Die Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin zeigte sich erst im Verlauf der Entwicklung der Keimlinge. Bis auf die Nachkommen der Kreuzung der Linien *gsgF* 125 und *as* 100, zeigten alle Nachkommen aus Kreuzungen mit *as*- oder *s/as*-Linien vergleichsweise früh die Inaktivierung des SPT-Gens. Für die Linie *gsgF* 136, für die in anderen Untersuchungen ebenfalls eine Inaktivierung des SPT-Gens nachgewiesen worden war (3.4.1), zeigte sich dies vergleichsweise später. Für die Linie *gsR* IR 102, die ebenfalls Inaktivierung des SPT-Gens gezeigt hatte (3.4.4), konnte zum Zeitpunkt der Aufnahmen noch keine Sensitivität gegenüber Streptomycin nachgewiesen werden.

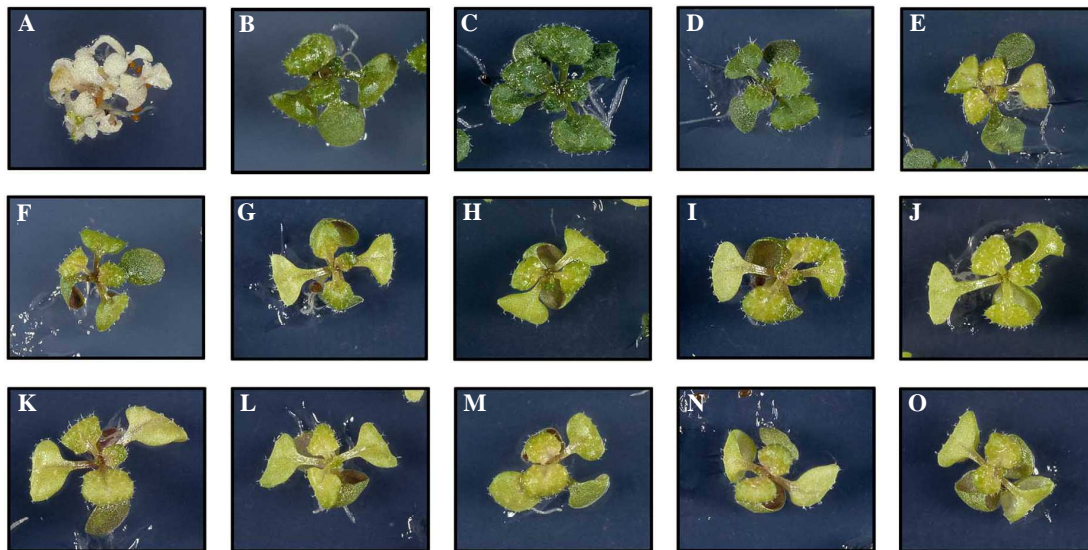


Abbildung 15: Inaktivierung des SPT-Gens in Nachkommen aus Kreuzungen von gs-, gsm- und gsg-Linien mit as- und s/as-Linien. Die Inaktivierung des SPT-Gens und die damit verbundene Sensitivität gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin ist am Chlorophyllverlust und einem Einrollen der Blätter erkennbar. Als Kontrollen wurden *A. thaliana* Wildtyp-Samen, Samen der Kreuzung der Linie gsgF 125 mit der Linie Δ 35g 105 sowie Samen der Linien gsgF 136 und gsR IR 102 auf Streptomycin-haltigem Medium ausgelegt. Die Nachkommen der Kreuzung der Linien gsgF 125 und Δ 35g 105 tragen neben zwei Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors eine promotorlose Kopie des GUS-Gens. Sie zeigten stabile GUS-Aktivität. Die Linie gsR IR 102 trägt eine invertierte Sequenzwiederholung der gsR-T-DNA und zeigt Silencing der Reportergene, welches im Verlauf der Entwicklung etabliert wird. Als weitere Kontrolle wurden Samen aus einer Kreuzung der Linie gsR 106 mit der Linie as 100 auf Kanamycin-haltigem Medium ausgelegt. **A)** *A. thaliana* Wildtyp, **B)** gsgF 125 x Δ 35g 105, **C)** gsR 106 x as 100 (Kanamycin), **D)** gsR IR 102, **E)** gsgF 136, **F)** gsgF 125 x as 100, **G)** gsmR 110 x as 100, **H)** gsF 110 x as 107, **I)** gsmF 130 x as 100, **J)** gsR 106 x as 100, **K)** gsR 106 x s/as 135, **L)** gsmR 110 x s/as 137, **M)** gsR 106 x s/as 137, **N)** gsF 104 x s/as 107, **O)** gsmF 130 x s/as 137

Um die Inaktivierung der GUS-, SPT- und GFP-Reportergene zu belegen, wurde eine Northern Blot-Analyse anhand verschiedener Kreuzungsnachkommen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abb. 16 A) zu sehen sind. Bei gleichzeitiger Anwesenheit einer GUS *sense* und *antisense* Kopie zeigen sich deutlich reduzierte steady state mRNA-Mengen des GUS-Gens, aber ebenso des SPT- und GFP-Gens. In Abb. 16 leuchtet bei der Hybridisierung mit einer SPT-Sonde ein zweites, verkürztes SPT-Transkript auf. Dieses wurde nicht immer gefunden, aber ausschließlich in Linien, die Silencing des SPT-Gens aufweisen (Schubert 2002).

Auch für Kreuzungen verschiedener gs-, gsg- und gsm-Linien mit as-Linien wurden Experimente zum Nachweis von siRNAs unternommen. SiRNAs des SPT- und GFP-Gens konnten erneut nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis von siRNAs für das GUS-Gen ist in Abb. 16 B) dargestellt. In allen Nachkommen von

Kreuzungen aus *gs*- und *gsg*- mit *as*-Linien sind diese zu erkennen. Die Inaktivierung der *sense* und *antisense* Kopien des GUS-Gens erfolgt also auf posttranskriptionellem Wege.

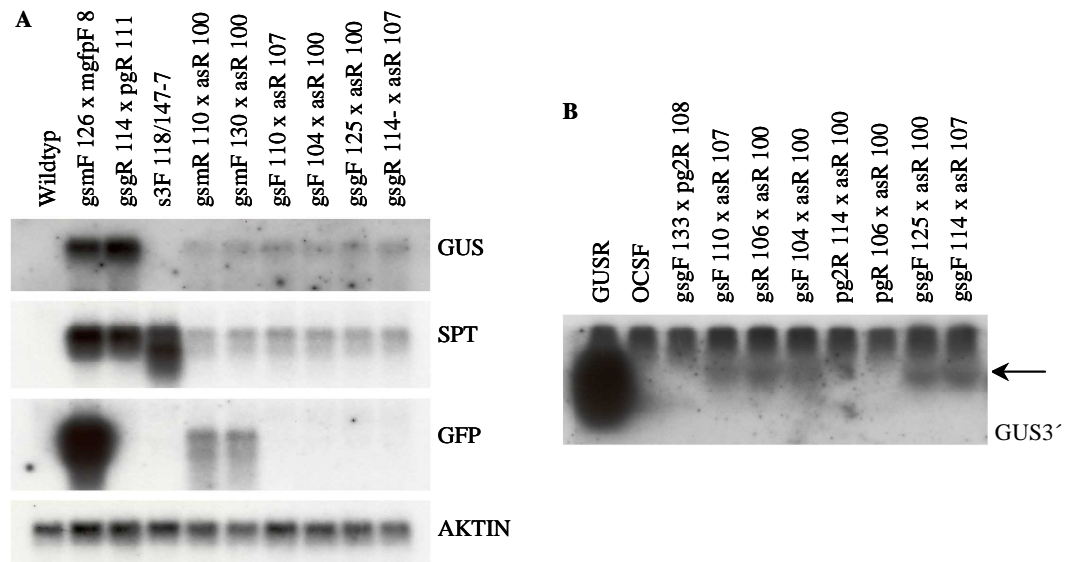


Abbildung 16: Inaktivierung des GUS-, SPT- und GFP-Gens in Nachkommen aus Kreuzungen von *gs*-, *gsm*- und *gsg*-Linien mit *as*-Linien. **A)** Northern Blot-Analyse anhand 8 Wochen alter Nachkommen von Kreuzungen von *gs*-, *gsm*- und *gsg*-Linien mit *as*-Linien. Als Kontrollen dienten Gesamt-RNAs aus Nachkommen von Kreuzungen einer *gsmF*- mit einer *mgfpF*-Linie, einer *gsgR*- mit einer *pgR*-Linie, der Linie *s3F* 118/147-7 sowie aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Linie *s3F* 118/147-7 trägt insgesamt 12 Kopien des SPT-Gens und zeigt posttranskriptionelle Inaktivierung dieses Reportergens (Schubert 2002). Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit GUS-, SPT-, GFP- und AKTIN-Sonden hybridisiert. **B)** Nachweis von GUS-siRNAs in Nachkommen von Kreuzungen von *gs*-, *gsm*- und *gsg*-Linien mit *as*-Linien. Das verwendete Blattmaterial stammte von denselben Pflanzen, die auch das Blattmaterial für die in A) gezeigte Northern Blot-Analyse lieferten und wurde zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Als Größenstandards dienten 75 ng des GUSR Oligonukleotids, gemischt mit 50 - 75 µg Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Als Kontrollen dienten Gesamt-RNAs aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen sowie aus Nachkommen einer Kreuzung einer *gsgF*- mit einer *pgR*-Linie. Es wurde jeweils eine komplette Gesamt-RNA-Präparation eingesetzt (50 - 75 µg). Die Membran wurde mit einer GUS3'-Sonde hybridisiert. Die Signale der siRNAs sind durch einen Pfeil markiert. Die oberhalb aufleuchtenden Signale sind unspezifisch.

Um zu überprüfen, ob auch schwach exprimierte GUS-Gene durch die gleichzeitige Expression eines *antisense* GUS-Gens inaktiviert werden, wurden Kreuzungen zwischen *pg*- und *as*-Linien durchgeführt. In vorangehenden Untersuchungen war gezeigt worden, dass promotorlose GUS-Gene nicht in der Lage sind Silencing auszulösen (Δ 35g-Linien, Forsbach 2001, Schubert 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden Kreuzungen zwischen *pg*- und *gsg*-Linien durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob schwach exprimierte Kopien des GUS-Gens in der Lage sind Silencing auszulösen.

Die Nachkommen der Kreuzungen von pg- mit gsg- bzw. as-Linien wurden in einer Northern Blot-Analyse auf die Expression der GUS *sense* und *antisense* Kopien hin untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

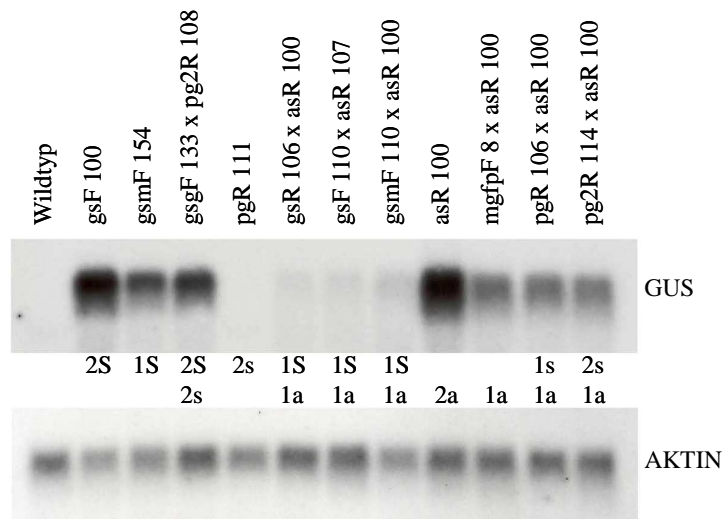


Abbildung 17: Expression des GUS-Gens in Nachkommen aus Kreuzungen von pg- mit gsg- bzw. as-Linien. Northern Blot-Analyse anhand 8 Wochen alter Nachkommen von Kreuzungen von pg- mit gsg- bzw. as-Linien. Als Kontrollen dienten Gesamt-RNAs aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen, aus einer gs-, einer gsm-, einer pg- und einer as-Linie sowie aus Nachkommen von Kreuzungen einer gs-, gsm- und einer mgfp-Linie mit einer as-Linie. Die Linie gsmF 154 ist für die T-DNA hemizygot (siehe 3.1). Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde mit einer strangspezifischen GUS-Sonde hybridisiert, so dass sowohl *sense* als auch *antisense* Transkripte aufleuchten. Nach Abwaschen der GUS-Sonde wurde die Membran mit einer AKTIN-Sonde hybridisiert. Zur Verdeutlichung sind Art und Anzahl der vorliegenden GUS-Kopien angegeben: S = GUS *sense* Kopien unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, s = GUS *sense* Kopien unter der Kontrolle des pnos-Promotors, a = GUS *antisense* Kopien unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors.

In den Kreuzungsnachkommen, die eine GUS *sense* und *antisense* Kopie unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors tragen, ist wie in Abb. 16 eine deutliche Reduktion beider GUS steady state RNA-Mengen zu erkennen (gsR 106 x as 100, gsF 110 x as 107, gsmF 110 x as 100). Kreuzungsnachkommen, die eine bzw. zwei GUS *sense* Kopien unter der Kontrolle des pnos-Promotors und eine *antisense* Kopie unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors tragen (pgR 106 x as 100, pg2R 114 x as 100) zeigen die gleiche Menge GUS *antisense* mRNA wie Kreuzungsnachkommen, die neben einer GUS *antisense* Kopie eine GFP-Kopie tragen (mgfpF 8 x as 100). Ein Vergleich zu einer Linie, die für die as-T-DNA homozygot ist und die doppelte Anzahl GUS *antisense* Kopien trägt (as 100), zeigt für die GUS *antisense* steady state mRNA einen positiven Gendosiseffekt. Offensichtlich kommt es weder in homozygoten as-Linien, noch in Linien, die neben einer stark

exprimierten GUS *antisense* Kopie schwach exprimierte GUS *sense* Kopie tragen, zum Silencing der *antisense* Kopien.

In den Nachkommen von Kreuzungen einer pg- mit einer gsg-Linie (gsgF 133 x pg2R 108 in Abb. 17 und gsgR 114 x pgR 111 in Abb. 16) liegen zwei GUS-Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S- sowie zwei GUS-Gene unter der Kontrolle des pnos-Promotors vor. Diese Kreuzungsnachkommen weisen GUS steady state mRNA-Mengen auf, die vergleichbar zu denjenigen einer Linie sind, die lediglich zwei GUS-Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors trägt (gsF 100 in Abb. 17). Folglich führt die Expression von GUS-Genen unter der Kontrolle eines vergleichsweise schwachen Promotors zusätzlich zur Expression zweier GUS-Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors nicht zum Silencing der GUS-Gene.

Die Linie pgR 111 zeigte keine Hybridisierung mit der GUS-Sonde. Dies liegt an der vergleichsweise schwachen Expression des GUS-Gens in pg-Linien (Abb. 13).

Für Nachkommen aus Kreuzungen von pg- mit gsg- bzw. as-Linien konnten keine GUS-Gen-spezifischen siRNAs nachgewiesen werden (Abb. 16). Dies unterstreicht, dass es in beiden Fällen nicht zu einer posttranskriptionellen Inaktivierung der GUS-Gene kommt.

3.4.4 Expression und Silencing der Reportergene in invertierten Sequenzwiederholungen

T-DNA Strukturen, bei denen zwei T-DNA Kopien invertiert zueinander vorliegen und die Grenzen der T-DNA aneinander stoßen (IRs), werden als Auslöser von Gen-Silencing diskutiert (zusammengefasst in Muskens *et al.* 2000). Die Linien gsR IR 102 und g1xF IR 57 hatten in der Southern Blot-Analyse zur Etablierung von Einzelkopielinien (3.1) Hinweise auf eine IR-Struktur gezeigt. So hatten beide Linien in der Analyse der RB in unterschiedlichen Restriktionen für RB/RB IRs zu erwartende Fragmente aufgewiesen. Die Linie gsR IR 102 hatte zwei LB-flankierende Fragmente gezeigt, die Linie g1xF IR 57 wies lediglich ein LB-flankierendes Fragment auf. Daraufhin wurden beide Linien einer ausführlichen Southern Blot- und zusätzlich einer PCR-Analyse unterzogen (Daten nicht gezeigt). Damit wurde für beide Linien sichergestellt, dass es sich tatsächlich um invertierte Sequenzwiederholungen handelt. Bei beiden stoßen die rechten Grenzen der T-DNAs unmittelbar aneinander. Während der IR in Linie gsR IR 102 aus zwei vollständigen T-DNAs besteht, weist in der Linie g1xF IR 57 eine T-DNA Kopie des IR eine Deletion von ca. 3,0 bis 3,4 kb an der LB auf (Abb. 18 A). Die T-DNA-Integrationen der Linien gsR

IR 102 und g1xF IR 57 befinden sich auf Chromosom IV (Positionen 49435 & 49442, Contig 28, AL161516) bzw. V (Position 128162, Klon T6G12, AL589883) im Genom von *A. thaliana*.

Beide Linien tragen im homozygoten Zustand 4 Kopien des GUS-Gens, die Linie gsR IR 102 zusätzlich 4 Kopien des SPT-Gens. Damit weisen sie die gleiche Zahl GUS-Kopien wie entsprechende Vertreter von gsg-Linien auf. Die im folgenden vorgestellte Analyse sollte untersuchen, ob die Linien gsR IR 102 und g1xF IR 57 sich bezüglich der Expression der Reportergene mit Vertretern von gsg-Linien vergleichen lassen, oder ob spezifische, durch die IR Struktur verursachte Effekte zu beobachten sind. Es wurden quantitative GUS-Tests sowie Northern Blot-Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 B) und 18 C) zu sehen. Bezüglich der GUS-Aktivität ist kein Unterschied zwischen den Linien gsR IR 102, g1xF IR 57 und der Linie gsgR 114 zu erkennen. Alle zeigen hohe GUS-Aktivität wenn sie zwei GUS-Kopien tragen (hemizygote Pflanzen), alle weisen niedrige GUS-Aktivität bzw. Silencing auf, wenn sie vier GUS-Kopien tragen (homozygote Pflanzen). Die quantitativen GUS-Aktivitätswerte der hemizygoten Vertreter der Linien gsR IR 102, g1xF IR 57 und gsgR 114 sind vergleichbar zu denen der homozygoten Vertreter der Linien gsF 114 und gsmF 106, die ebenfalls zwei GUS-Kopien tragen. Hemizygote Vertreter letzterer Linien, die nur eine GUS-Kopie tragen, zeigen wiederum eine ca. 50 % niedrigere GUS-Aktivität.

Die Ergebnisse des quantitativen GUS-Tests stehen im Einklang mit den in der Northern Blot-Analyse gezeigten steady state GUS-mRNA-Mengen (Abb. 18 C). Ferner belegt die Northern Blot-Analyse, dass es in den für die T-DNA homozygoten Vertretern der Linien gsgR 114 und gsR IR 102 zu einer Reduktion der steady state mRNA-Menge des SPT-Gens kommt. Für die hemi- und homozygoten gs- und gsm-Linien zeigt sich für die Expression des SPT-Gens ein positiver Gendosiseffekt.

Anhand kolorimetrischer GUS-Aktivitätstests konnte belegt werden, dass die Inaktivierung des GUS-Gens in den Linien, die einen IR tragen, in jeder Generation erneut etabliert wird (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf einen posttranskriptionellen Mechanismus hin.

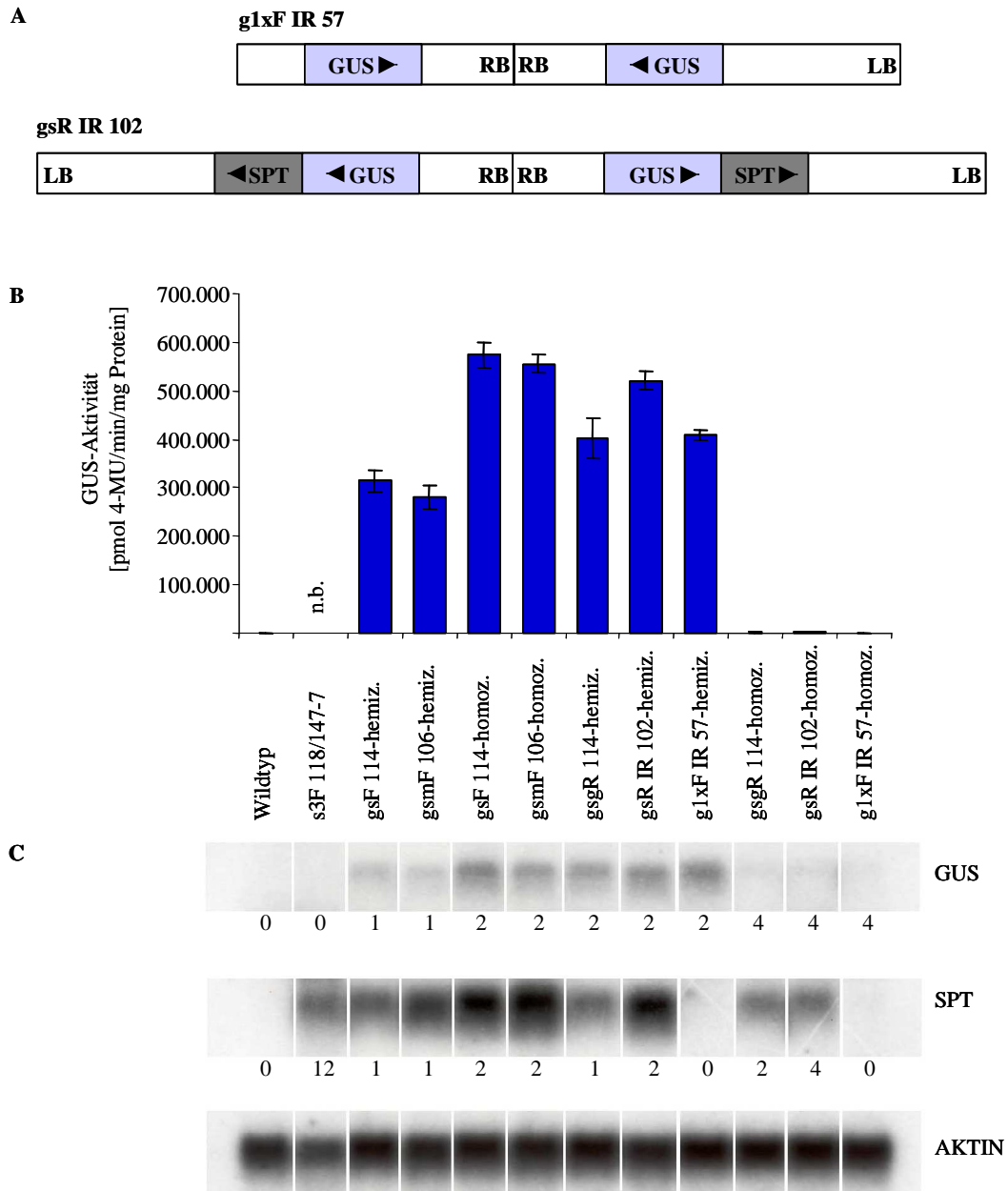


Abbildung 18: Expression des GUS- und SPT-Gens in invertierten Sequenzwiederholungen.
A) Schematische Darstellung der invertierten Sequenzwiederholungen der Linien g1xF IR 57 und gsR IR 102. Während der IR in Linie gsR IR 102 aus zwei vollständigen T-DNAs besteht, weist in der Linie g1xF IR 57 eine T-DNA-Kopie des IR eine Deletion von ca. 3,0 bis 3,4, kb an der LB auf. Die Transkriptionsrichtung der Reportergene ist durch Pfeile markiert. **B)** Ergebnisse quantitativer GUS-Tests 8 Wochen alter homo- und hemizygoter Vertreter der Linien g1xF IR 57 und gsR IR 102. Als Kontrollen dienten homo- und zum Teil hemizygoter Vertreter von gs-, gsm- oder gsg-Linien sowie *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. **C)** Northern Blot-Analyse anhand 8 Wochen alter Pflanzen. Die gezeigten Linien sind die gleichen wie die unter B). Zusätzlich wurde die Linie s3F 118/147-7 analysiert. Diese trägt insgesamt 12 Kopien des SPT-Gens und zeigt posttranskriptionelle Inaktivierung dieses Reportergens (Schubert 2002). Die untersuchten Linien weisen unterschiedliche Kopienzahlen des GUS- und SPT-Gens auf. Diese sind unterhalb der Ergebnisse der einzelnen Hybridisierungen angegeben. Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit GUS-, SPT- und AKTIN-Sonden hybridisiert.

Die Linien gsR IR 102 und g1xF IR 57, die zwei GUS-Gene in einer IR-T-DNA Struktur tragen, entsprechen somit in allen untersuchten Punkten, die die Expression bzw. das Silencing der Reportergene betreffen, den Vertretern der gsg-Linien, die zwei GUS-Gene in einer Tandem-Organisation in ihrer T-DNA tragen. Die stabile Expression des GUS-Gens in den hemizygoten gsg- und IR-Linien zeigt, dass das Vorliegen von Sequenzwiederholungen nicht hinreichend ist um Silencing zu induzieren.

3.4.5 Vereinzelttes Auftreten einer Inaktivierung der Reportergene in *A. thaliana* Einzelkopielinien, die lediglich je zwei Kopien der Reportergene tragen

Es konnte belegt werden, dass RNA-Silencing der Reportergene mit dem Überschreiten eines transkriptionellen Schwellenwertes korreliert (Schubert 2002). In Linien, die drei oder mehr GUS-Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors gleichzeitig exprimieren, wird diese Schwelle regelmäßig überschritten, und es kommt zum Silencing des GUS-Gens (Schubert 2002, siehe auch 3.4.1). In wenigen Einzelfällen waren auch Linien, die lediglich zwei Kopien dieses Reportergens tragen, von Silencing des GUS-Gens betroffen. Als Beispiel ist der Verlust der GUS-Aktivität in zwei Vertretern der Linie gsR 108 in Abb. 19 A) gezeigt.

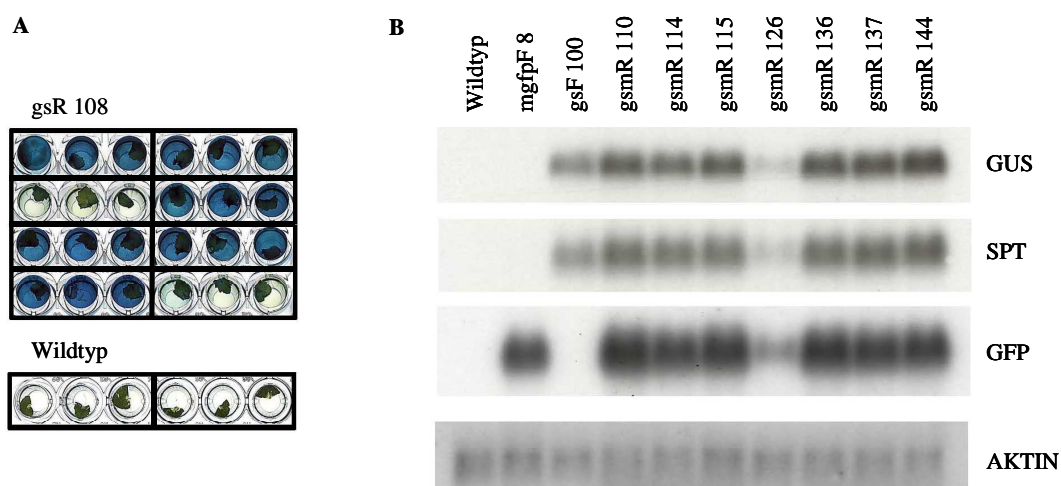


Abbildung 19: Inaktivierung der Reportergene in homozygoten Linien, die lediglich je zwei Kopien dieser Gene tragen. **A)** Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests für 7 Wochen alte Vertreter der Linie gsR 108. Pro Pflanze wurden drei kleine Rosettenblätter für den Test verwendet. Als Kontrollen dienten *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. **B)** Northern Blot-Analyse anhand 8 Wochen alter Pflanzen von 7 gsmR-Linien. Als Kontrollen diente Gesamt-RNA aus Pflanzen einer gsF- und einer mgfpF-Linie sowie aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Es wurden jeweils 7,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit GUS-, SPT-, GFP- und AKTIN-Sonden hybridisiert.

Für die Linie *gsmR* 126, die in gleicher Weise Inaktivierung des GUS-Gens zeigte, wurde eine Northern Blot-Analyse zusammen mit anderen *gsm*-Linien durchgeführt, um die Expression der GFP- und SPT-Gene zu überprüfen (Abb. 19 B). Es stellte sich heraus, dass die steady state mRNA Menge bei allen drei Reportergenen erniedrigt waren.

3.5 Expression des GUS-Reportergens in *N. tabacum*

Alle bisher vorgestellten Ergebnisse betrafen die Expression der Reportergene in *A. thaliana*. Ihre Übertragbarkeit auf eine andere Pflanzenspezies sollte durch eine Analyse von 18 transgenen *N. tabacum* *gsm*-Einzelkopielinien überprüft werden (3.1). Diese wurden mittels kolorimetrischer und quantitativer GUS-Tests untersucht. Abb. 20 stellt das Ergebnis eines quantitativen GUS-Tests für drei Wochen alte Pflanzen der T2-Generation dar. Es wurden 17 der 18 etablierten, unabhängigen Linien untersucht. Für fünf *gsmF*-Linien und zwei *gsmR*-Linien wurden zusätzlich die Nachkommen zweier Geschwisterpflanzen analysiert.

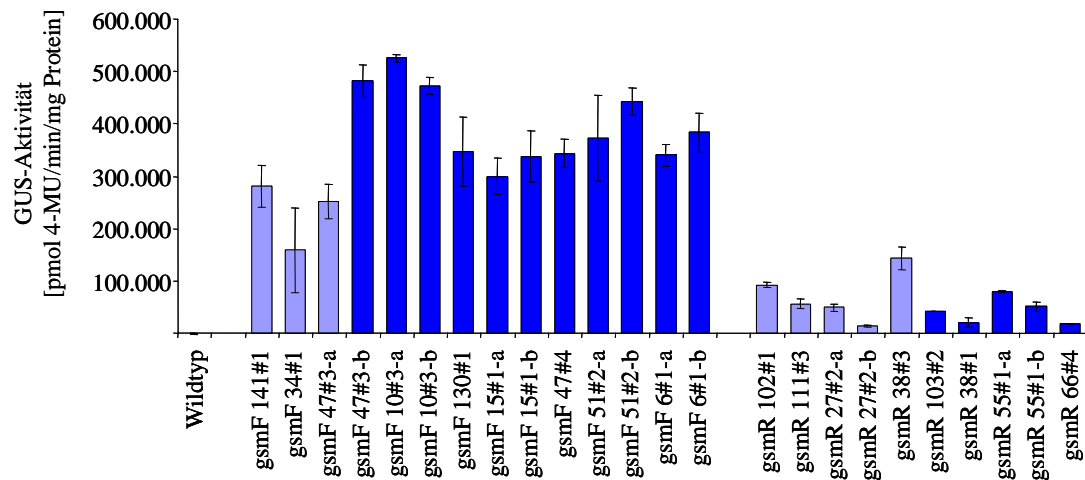


Abbildung 20: GUS-Aktivitäten in *N. tabacum* *gsmF*- und *gsmR*-Linien. Ergebnisse quantitativer GUS-Tests 3 Wochen alter Nachkommen homo- und hemizygoter Vertreter von *N. tabacum* Einzelkopielinien. Geschwisterlinien sind durch die Buchstaben a und b unterschieden. Für den GUS-Test wurden zweimal 15 bis 20 Blättchen unterschiedlicher Pflanzen zu jeweils zwei Extrakten verarbeitet, anhand derer die GUS-Aktivität bestimmt wurde. Folglich wurde in jeder unabhängigen Linie die GUS-Aktivität anhand von 30 bis 40 Pflanzen gemittelt. Als Kontrollen dienten *N. tabacum* Wildtyp-Pflanzen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Die dunkelblauen Balken repräsentieren Werte, die in Nachkommen von für die T-DNA homozygoten Pflanzen ermittelt wurden. Die hellblauen Balken repräsentieren Werte, die in Nachkommen von für die T-DNA hemizygoten Pflanzen gemessen wurden.

Es wurden Nachkommen von für die T-DNA hemi- und homozygoten Pflanzen untersucht.

Die Nachkommen von für die T-DNA hemizygoten Pflanzen sind für die T-DNA entweder hemi- oder homozygot. Das Verhältnis der beiden Klassen beträgt dabei 2:1. Daraus und aus der in der jeweiligen Klasse vorliegenden Zahl an GUS-Kopien sollte sich für die Nachkommen hemizygoter Pflanzen eine um ca. 1/3 niedrigere mittlere GUS-Aktivität ergeben als für Nachkommen homozygoter Pflanzen. Innerhalb der gsmF-Linien zeigt sich dies für die Linien 141#1, 34#1 und 47#3. Zieht man dies in Betracht, so weisen die drei Wochen alten gsmF-Linien eine einheitliche und relativ hohe Expression des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors auf. Die Unterschiede zwischen den Nachkommen unabhängiger, homozygoter gsmF-Linien betragen maximal 1,8-fach, die Unterschiede zwischen den Nachkommen hemizygoter Pflanzen betragen ebenfalls maximal 1,8-fach. Die Nachkommen zweier Geschwisterpflanzen zeigen maximale Unterschiede von 1,2-fach.

Gegenüber den gsmF-Linien weisen die gsmR-Linien deutlich geringere Werte für die GUS-Aktivität auf. Der maximale Unterschied zwischen Nachkommen homozygoter gsmF- und gsmR-Pflanzen ist nahezu 30-fach. Die GUS-Aktivität der Nachkommen hemizygoter gsmR-Pflanzen ist nicht um ca. 1/3 niedriger als die GUS-Aktivität der Nachkommen homozygoter gsmR-Pflanzen. Im Gegenteil zeigen die Nachkommen der Linie gsmR 38#3 die höchste der innerhalb der gsmR-Linien gemessenen GUS-Aktivitäten. Der maximale Unterschied zwischen den Nachkommen unabhängiger, homozygoter gsmR-Pflanzen ist 4,5-fach.

Die geringere GUS-Aktivität der gsmR- gegenüber den gsmF-Linien spiegeln auch die kolorimetrischen GUS-Aktivitätstests der drei Wochen alten Pflanzen wieder (Abb. 21). Dargestellt sind beispielhaft jeweils sechs Nachkommen hemi- und homozygoter Pflanzen für die gsmF- und gsmR-T-DNA. Alle Vertreter der gsmF-Linien zeigen gleichmäßige und vergleichsweise starke Blaufärbung und damit ebensolche GUS-Aktivität. In den Nachkommen der gsmR-Linien zeigen sich nicht nur deutlich niedrigere Aktivitäten und größere Variabilität zwischen einzelnen Linien, sondern auch Unterschiede in der GUS-Aktivität zwischen den Nachkommen einer Linie, wie z. B. für die homozygoten Nachkommen der Linien 27#2-a und 103#2. Die Nachkommen der Linie gsmR 38#3 weisen verglichen mit den übrigen gsmR-Linien relativ starke GUS-Aktivität auf. Dies ist in Übereinstimmung mit den quantitativ ermittelten Werten (Abb. 20). Dort zeigt die Linie gsmR 38#3 Werte auf dem Niveau der Linie gsmF 34#1, die unter den gsmF-Linien die vergleichsweise niedrigste GUS-Aktivität aufweist. Sowohl die Linie gsmR 38#3 als auch

die Linie gsmF 34#1 zeigten im kolorimetrischen GUS-Aktivitätstest gleichmäßige Blaufärbung (Abb. 21).

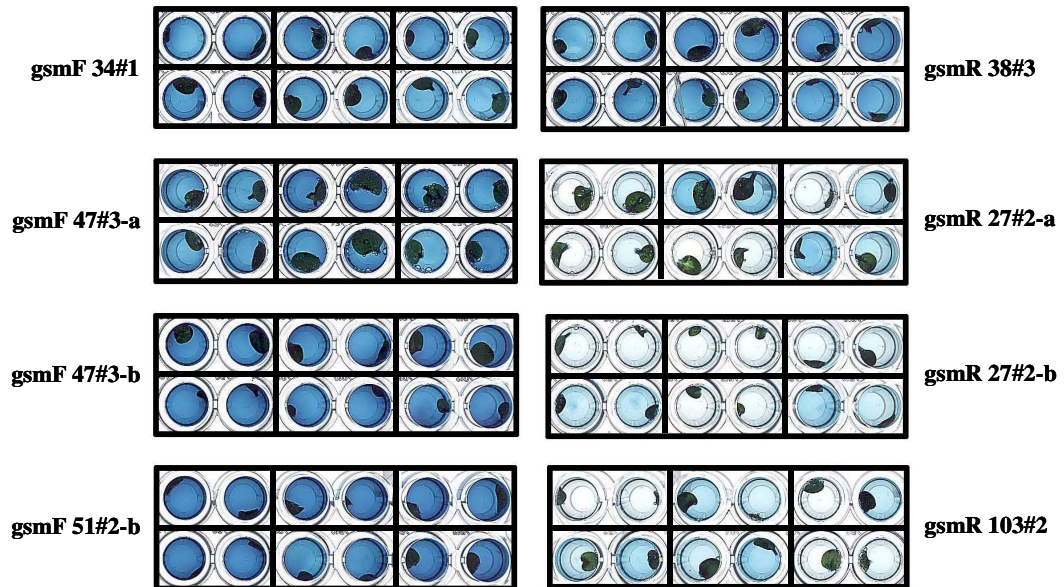


Abbildung 21: Kolorimetrischer GUS-Aktivitätstest in *N. tabacum* gsmF- und R-Linien der T2-Generation. Für jede Linie wurden 6 Pflanzen im Alter von drei Wochen untersucht. Pro Pflanze wurden zwei kleine Blattstückchen für den Test verwendet.

Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests für 6 und 11 Wochen alte Tabakpflanzen belegten, dass sich die GUS-Aktivität bei gsmR-Linien weiter erniedrigt (Daten nicht gezeigt). Eben solche Tests anhand 6 und 11 Wochen alter Pflanzen der gsmF-Linien zeigten, dass das GUS-Gen in diesen Linien einer Inaktivierung unterliegt. Die Abb. 22 belegt dies. Bei den dargestellten Pflanzen handelt es sich um die T1-Generation. Nachkommen dieser Pflanzen sind in Abb. 21 dargestellt. Hier hatten 3 Wochen alte Pflanzen der Linien 34#1, 47#3-a und b sowie 51#2-b vergleichsweise hohe GUS-Aktivität. Dies macht deutlich, dass die Inaktivierung des GUS-Gens in *N. tabacum* meiotisch reversibel ist. In Abb. 22 ist zu erkennen, dass das Silencing des GUS-Gens offensichtlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten in einzelnen Pflanzen einsetzt und im Laufe der Entwicklung der Pflanzen zunimmt. Während die Pflanzen 10#3 und die Geschwister 15#1-a und 15#1-b gar keine Inaktivierung des GUS-Gens aufweisen, ist in den Pflanzen 51#2-b und 130#1 bereits nach 6 Wochen Silencing des GUS-Gens deutliche zu erkennen. Andere Pflanzen, die nach 6 Wochen noch hohe GUS-Aktivität zeigen, haben diese nach 11 Wochen ebenfalls eingebüßt (47#3-a, 51#2-a). Die Geschwisterpflanzen 6#1-a und 6#1-b zeigen nach 11 Wochen lediglich in einzelnen Blättern eine Verringerung der GUS-Aktivität. Die im

Verlauf der Entwicklung etablierte Inaktivierung des GUS-Gens deutet darauf hin, dass es sich auch in *N. tabacum* um posttranskriptionelles Silencing des GUS-Gens handelt.

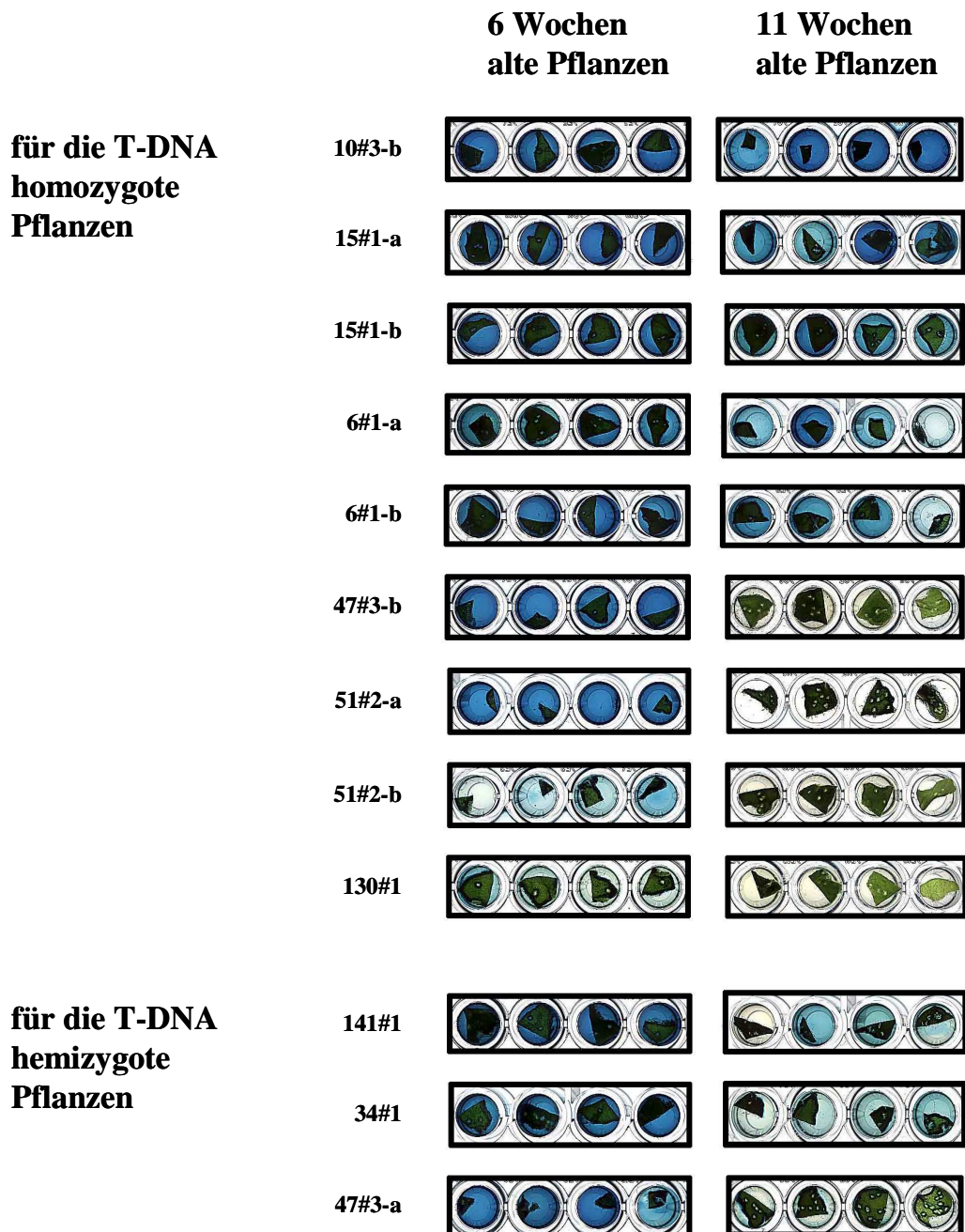


Abbildung 22: Inaktivierung des GUS-Gens in *N. tabacum* gsmF-Linien der T1-Generation. Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests für 6 und 11 Wochen alte Vertreter von *N. tabacum* Pflanzen die eine gsmF-T-DNA hemi- oder homozygot tragen. Pro Pflanze wurden vier kleine Blattstückchen für den Test verwendet.

Nicht nur für die T-DNA homozygote Tabakpflanzen, die an den homologen Loci insgesamt 2 Kopien des GUS-Gens tragen, zeigen Silencing dieses Reportergens. Auch hemizygote Pflanzen mit lediglich einer Kopie des GUS-Gens zeigen dessen Inaktivierung. Dies sind die Pflanzen 141#1, 34#1 und 47#3-b in Abb. 22.

3.6 Expression der Reportergene in *A. thaliana* T-DNA-Populationen

3.6.1 Expression des GUS-Reportergens in Linien einer *A. thaliana* Population, die eine Dg-T-DNA tragen

Die vorangegangenen Kapitel dieser Arbeit belegen, dass die Expression von Transgenen von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß derartige Faktoren für die beobachtete Variabilität der Expression von Transgenen in T-DNA-transformierten Populationen verantwortlich sind und inwieweit andere Einflüsse zum Tragen kommen. So wurde z. B. im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, wie sich umfassendere Rearrangements der T-DNA auf die Expression der Reportergene auswirken. Für einige komplexe T-DNA-Integrationen wurde transkriptionelles Silencing der verwendeten Reportergene beschrieben (Mittelsten-Scheid *et al.* 1991, Park *et al.* 1996).

Die Mitglieder der analysierten, sogenannten Dg-Population waren mit den DgF- und DgR-T-DNAs transformiert worden, die je ein GUS-Gen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors trugen. Die Dg-Population umfasste 38 unabhängige Linien der T1-Generation.

Die GUS-Aktivität der Linien der Dg-Population wurde sowohl mittels quantitativer als auch kolorimetrischer Tests in 4 und 9 Wochen alten Pflanzen bestimmt. Die innerhalb der Population ermittelten GUS-Aktivitäten umfassten einen sehr großen Bereich. Um dies zu verdeutlichen, ist in Abb. 23 das Ergebnis des quantitativen GUS-Tests der 4 Wochen alten Pflanzen dargestellt.

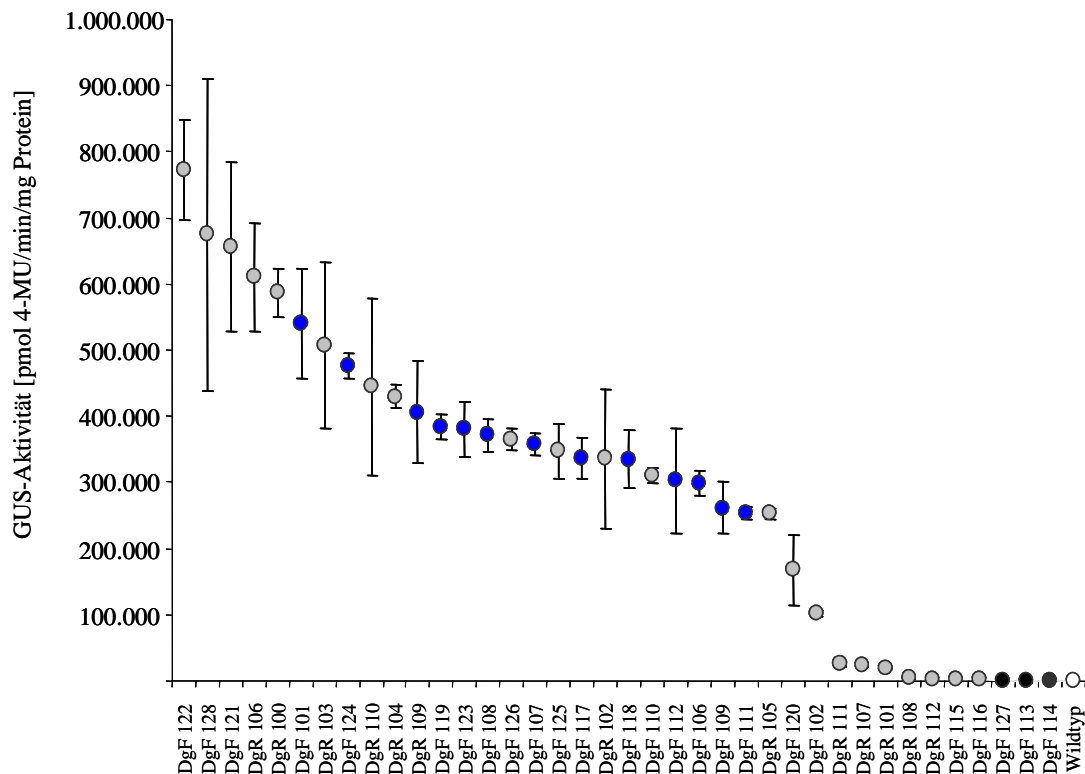


Abbildung 23: GUS-Aktivitäten der Linien der Dg-Population. Ergebnisse quantitativer GUS-Aktivitätstests 4 Wochen alter Pflanzen. Die Werte finden sich in Tab. 9 und wurden der Höhe nach geordnet. Die blauen Punkte markieren Linien, die auch in weiteren quantitativen und kolorimetrischen Tests hohe und stabile GUS-Aktivität zeigten. Die grauen Punkte markieren Linien, die Inaktivierung des GUS-Gens zeigten, schwarze Punkte markieren drei Linien, die in allen Tests keine erkennbare GUS-Aktivität zeigten. Der offene Kreis markiert die Wildtyp-Kontrolle. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

Die maximalen Unterschiede der GUS-Aktivität zwischen allen Linien, die im kolorimetrischen GUS-Aktivitätstest erkennbare Aktivität aufwiesen (Daten nicht gezeigt), liegen bei ca. 400-fach. In einigen Linien zeigte sich starke Variabilität der GUS-Aktivität zwischen zwei unabhängigen Extrakten, die sich in den zum Teil großen Standardabweichungen widerspiegeln. Ein zweiter quantitativer GUS-Test wurde anhand der 9 Wochen alten Pflanzen durchgeführt (Tab. 9). Es stellte sich heraus, dass die Variabilität noch zunahm. Sie betrug jetzt ca. 1500-fach.

Anhand der in den quantitativen und kolorimetrischen GUS-Aktivitätstests erhaltenen Ergebnisse wurden die Linien in drei Gruppen eingeteilt. Eine erste Gruppe enthält alle Linien ohne erkennbare GUS-Aktivität, sie umfasst drei DgF-Linien. Alle Linien, die Inaktivierung des GUS-Gens oder sehr niedrige GUS-Aktivitäten zeigten, wurden in Gruppe 2 zusammengefasst. Gruppe 2 umfasst 17 Dg-Linien (8 DgF-, 9 DgR-Linien). Alle Linien, die durch die durchgeführten GUS-Aktivitätstests stabile und hohe Expression des

GUS-Gens gezeigt hatten, bilden Gruppe 3. Dies waren 14 DgF- und 4 DgR-Linien, also insgesamt 18 Linien. Die Unterschiede bezüglich der quantitativ ermittelten GUS-Aktivität betragen in dieser Gruppe maximal ca. 2,3-fach.

Die Ergebnisse einer Segregationsanalyse für die Linien der Dg-Population ist in Tab. 4 zusammengefasst.

Tabelle 4
Segregationsanalyse der Dg-Population

Gruppe	Zahl der Linien	Segregation			
		1 Locus	2 oder mehr Loci	aberrant	n.b.
1: keine					
Aktivität	3	1	2		
%	100	33,3	66,7		
2: Verlust oder					
niedrige Aktivität	17	7	8	[1,1:1]	1
%	100	41,2	47,1	5,9	5,9
3: stabil hohe					
Aktivität	18	14		[1,5:1]; [1,8:1]; [1,7:1]	1
%	100	77,8		16,7	5,6
Gesamt					
	38	22	10	4	2
%	100	57,9	26,3	10,5	5,3

Ein Verhältnis von resistenten zu sensitiven Pflanzen von 3:1 deutet auf einen, ein Verhältnis von größer 3:1 deutet auf 2 und mehr Loci hin, an denen T-DNAs integriert sind. Den Mendelschen Regeln nicht entsprechende Segregationen wurden als aberrant eingestuft und sind aufgeführt. Einzelne Segregationen waren nicht auswertbar (n.b.).

In der Gruppe 3, die stabile Expression des GUS-Genes besaß, wiesen die ermittelten Segregationszahlen für 14 von 18 Linien auf eine Integration der T-DNA an einem Locus hin. Innerhalb der Gruppe der Linien, die Inaktivierung des GUS-Gens aufwies, war dies für weniger als die Hälfte der Linien der Fall. Ungefähr die Hälfte dieser Linien zeigte durch die ermittelten Segregationszahlen eine Integration von T-DNA an mehr als einem Locus an. In der Gruppe, die keine erkennbare GUS-Aktivität besaß, wiesen zwei Linien eine Integration von T-DNA an einem, eine Linie eine Integration der T-DNA an zwei oder mehreren Loci auf. Für zwei Linien waren die ermittelten Segregationsdaten nicht aussagekräftig, da die Zahl der gekeimten Samen zu gering war. 4 Linien zeigten eine nicht den Mendelschen Regeln entsprechende Segregation.

Die durchgeführte Southern Blot-Analyse bediente sich der in Tab. 5 aufgelisteten Restriktionsenzyme sowie der dort genannten Sonden zur Hybridisierung resultierender Membranen. Abb. 24 stellt dazu eine Restriktionskarte der DgF- bzw. DgR-T-DNA inklusive der Lage der eingesetzten Hybridisierungssonden dar.

Tabelle 5

Liste der für die Southern Blot-Analyse der Dg-Population verwendeten Restriktionsenzyme und der zur Hybridisierung verwendeten Sonden

Dg	Restriktionsenzym(e)	LB	NPT	GUS	OCS	RB
F/R	<i>HindIII</i>	X			X	X
F	<i>BamHI</i>		X	X		X
R	<i>BamHI</i>			X	X	
R	<i>EcoRI/BglII</i>		X	X		X
F	<i>BglII</i>			X	X	

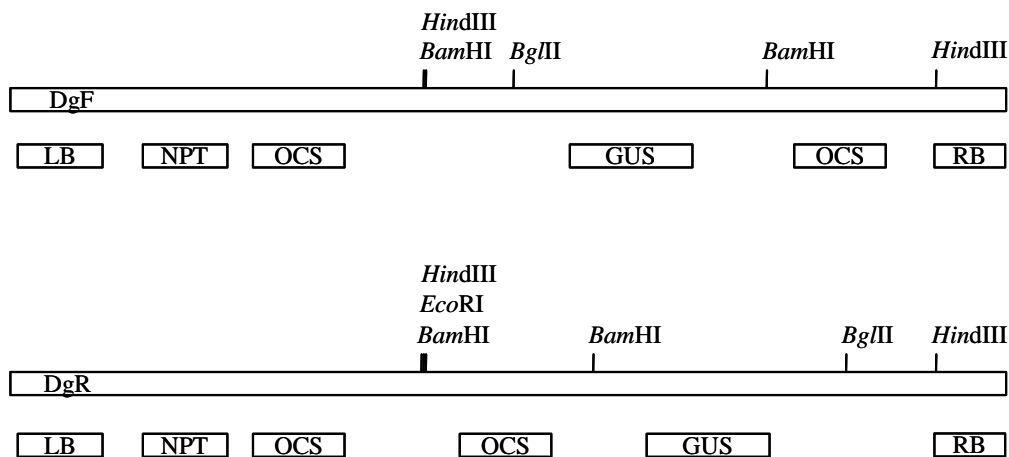


Abbildung 24: Restriktionskarten der DgF- und DgR-T-DNAs, sowie die Lage der verwendeten Hybridisierungssonden.

Beispielhaft für diese Analyse ist in Abb. 25 die Hybridisierung mit einer OCS-Sonde als Endergebnis eines Southern Blot-Experiments dargestellt.

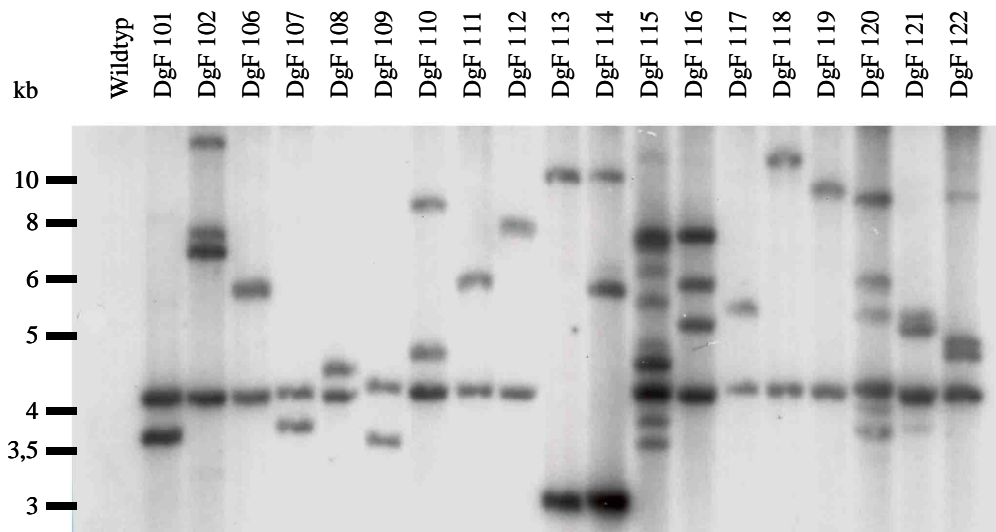


Abbildung 25: Southern Blot-Analyse der Dg-Population. Beispielhaft ist das Ergebnis einer Southern Blot-Analyse gezeigt, bei der Gesamt-DNA der gezeigten Linien mit dem Enzym *Hind*III restringiert wurde. Die resultierende Membran wurde mit einer OCS-Sonde hybridisiert. Als Kontrolle diente *A. thaliana* Wildtyp-Gesamt-DNA.

In den Dg-T-DNAs werden sowohl das GUS- als auch das NPT-Gen vom *ocs3'*-Ende gefolgt (Abb. 2). In Abb. 25 sind deshalb sowohl das bei der durchgeführten *Hind*III Restriktion spezifische Fragment der Reportergen-kassette (4,4 kb) als auch weitere linienspezifische Fragmente zu erkennen. Diese resultieren aus der *Hind*III Restriktion innerhalb der T-DNA und einer weiteren Schnittstelle für dieses Enzym innerhalb der die T-DNA flankierenden genomischen Sequenzen. Der variable Abstand dieser Restriktionsschnittstellen zur T-DNA führt für jede T-DNA-Integration zu distinkten Restriktionsfragmenten. Im vorliegenden Fall werden sie durch die Hybridisierung der *ocs3'*-Sequenz sichtbar gemacht und werden dementsprechend als LB-flankierende Fragmente bezeichnet. Fragmente, die sich durch analoge Southern Blot-Experimente an der RB der T-DNA ergeben, werden als RB-flankierende Fragmente bezeichnet.

Ein für Einzelkopielinien zu erwartendes Hybridisierungsmuster zeigen z. B. die Linien DgF 101 und 106 (Abb. 25). Ein Beispiel für die Integration mehrerer T-DNAs sind die Linien DgF 115 und 116, für eine fehlende oder aberrante Reportergen-kassette die Linien DgF 113 und 114. Mit Hilfe weiterer Southern Blot-Experimente wurde die Zahlen der LB- und RB-flankierenden Fragmente abgeschätzt. Diese geben Hinweise auf die Zahl integrierter T-DNAs Tab. 6 fasst die Analyse der LB zusammen.

Tabelle 6
Maximale Zahl der LB-flankierenden Fragmente unterschiedlicher Größe in den Linien der Dg-Population

Gruppe	Zahl der Linien	maximale Zahl LB-flankierender Fragmente unterschiedlicher Größe			
		1	2	3	>3
Gruppe 1	3		2	1	
[%]	100,0		66,7	33,3	
Gruppe 2	17		9	4	4
[%]	100,0		52,9	23,5	23,5
Gruppe 3	18	12	5		1
[%]	100,0	66,7	27,8		5,6
Gesamt aller Gruppen	38	12	16	5	5
[%]	100,0	31,6	42,1	13,2	13,2

Alle Linien innerhalb der Gruppe 2, die Inaktivierung des GUS-Gens zeigten, wiesen zwei oder mehr LB-flankierende Fragmente auf. Innerhalb der Gruppe 3, deren Linien eine stabile GUS-Aktivität besaßen, wiesen 17 von 18 Linien lediglich ein oder zwei LB-flankierende Fragmente auf. Nur eine Linie zeigte mehr als drei LB-flankierende Fragmente. Innerhalb der gesamten Population wiesen somit 12 Linien (ca. 32 %) ein, 16 Linien (ca. 42 %) zwei, 5 Linien (ca. 13 %) drei und ebenfalls 5 Linien (ca. 13 %) mehr als drei LB-flankierende Fragmente auf.

Die komplementäre Analyse der RB ist in Tab. 7 zu sehen. Hier zeigten 23 Linien (ca. 61 %) ein, 7 Linien (ca. 18 %) zwei, 5 Linien (ca. 13 %) drei und 2 Linien (ca. 5 %) mehr als drei RB-flankierende Fragmente. Eine Linie zeigte keine Hybridisierung mit der RB-Sonde. Innerhalb der Gruppe der Linien, die eine stabile GUS-Aktivität besaßen, wies keine Linie mehr als zwei RB-flankierende Fragmente auf. Innerhalb der Gruppe der Linien, die Inaktivierung des GUS-Gens aufwiesen, zeigten 11 von 17 Linien (ca. 65 %) zwei oder mehr RB-flankierende Fragmente.

Für drei Linien (DgF 110, 128 und DgR 101) ergab die Southern Blot-Analyse der LB und RB klare Hinweise auf invertiert zueinander vorliegende Sequenzwiederholungen (IRs), wobei in allen Fällen die rechten Grenzen der T-DNAs aneinander stoßen. Für die Linien DgF 110, 128 und DgR 101 leuchteten in den Analysen der LB jeweils zwei LB-flankierende Fragmente auf (z. B. DgF 110, Abb. 25). In den Analysen der RB wurden aufgrund der IR-Struktur für die Linien DgF 128 und DgR 101 in drei, und für die Linie

DgF 110 in zwei unterschiedlichen Southern Blot-Analysen Fragmente in erwarteter Größe detektiert. Alle drei IR-Linien wiesen Silencing des GUS-Gens auf.

Tabelle 7
Maximale Zahl der RB-flankierenden Fragmente unterschiedlicher Größe in den Linien der Dg-Population

Gruppe	Zahl der Linien	maximale Zahl RB-flankierender Fragmente unterschiedlicher Größe				
		0	1	2	3	>3
Gruppe 1	3	1	1	1		
[%]	100,0	33,3	33,3	33,3		
Gruppe 2	17		6*	4	5	2
[%]	100,0		35,3	23,5	29,4	11,8
Gruppe 3	18		16	2		
[%]	100,0		88,9	11,1		
Gesamt aller Gruppen	38	1	23	7	5	2
[%]	100,0	2,6	60,5	18,4	13,2	5,3

* unter diesen sechs Linien befinden sich die Linien DgF 110, DgF 128 und DgR 101, die vermutlich einen IR tragen, bei denen die rechten Grenzen der T-DNA aneinander stoßen (s.o.).

Abschließend wurde mittels weiterer Southern Blot-Analysen die Integrität der Reportergenkassette überprüft. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tab. 8 zusammengestellt.

Tabelle 8
Integrität der T-DNA in den Linien der Dg-Population

Gruppe	Zahl der Linien	keine Hybridisierung	intakte Reportergenkassette	intakte und rearrangierte Reportergenkassetten	nur rearrangierte Reportergenkassetten
1	3	2			1
2	17		13	4	
3	18		17		1

Für die drei Linien, die keinerlei GUS-Aktivität besaßen, zeigte sich in zwei Fällen keine Hybridisierung mit einer GUS-Sonde, im dritten Fall deutete das in der Hybridisierung erhaltene Fragment auf eine rearrangierte Reportergenkassette hin. In den Linien, die von

Inaktivierung des GUS-Gens betroffen waren, zeigten 13 von 17 Linien eine intakte GUS-Reportergenkassette. Bei 4 Linien zeigten sich zusätzlich zu intakten, rearrangierte Reportergenkassetten. In der Gruppe der Linien, die stabile GUS-Aktivität zeigten, wies lediglich eine Linie ein Rearrangement der Reportergenkassette auf, für alle übrigen 17 Linien zeigte die Southern Blot-Analyse eine intakte GUS-Reportergenkassette.

Einige Linien, die Silencing des GUS-Gens aufwiesen, wurden in der folgenden Generation mittels einer Northern Blot-Analyse getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 und 27 dargestellt.

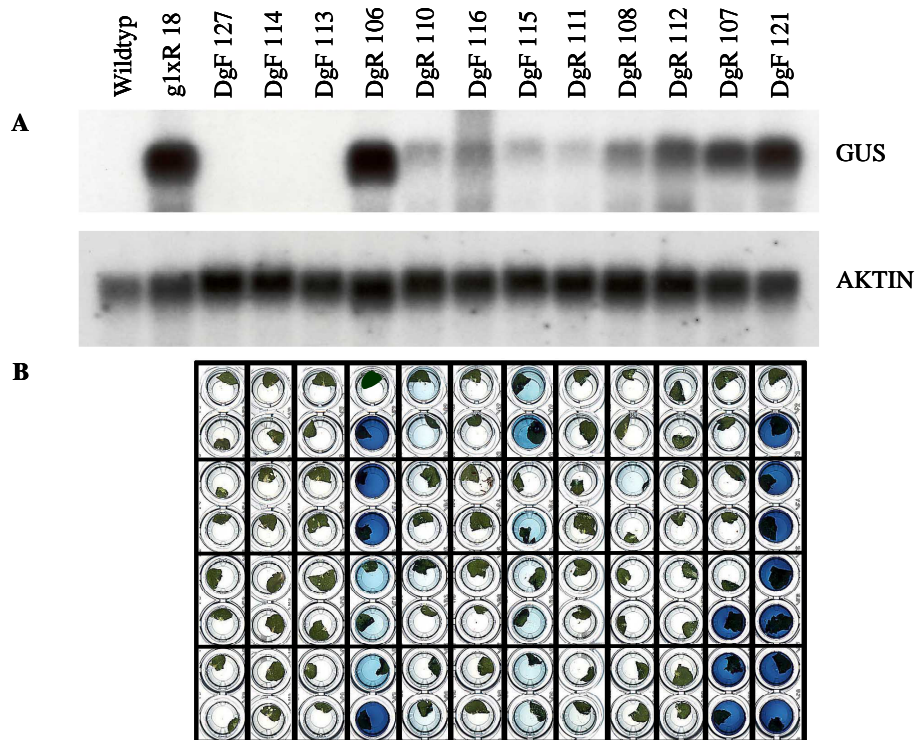


Abbildung 26: Steady state mRNA-Mengen in Linien der Dg-Population, die vom Silencing des GUS-Gens betroffen sind. A) Northern Blot-Analyse anhand 8 Wochen alter Pflanzen von 12 Dg-Linien. Als Kontrollen diente Gesamt-RNA aus Pflanzen der Linie g1xR 18 sowie aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Die Linie g1xR 18 trägt zwei Kopien des GUS-Gens unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors. Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die resultierende Membran wurde nacheinander mit GUS- und AKTIN-Sonden hybridisiert. B) Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests für 8 Wochen alte Pflanzen. Die Linien sind identisch zu den in der Northern Blot-Analyse gezeigten. Jede vertikale Spalte entspricht den Pflanzen einer Linie. Pro Pflanze wurden zwei kleine Rosettenblätter für den Test verwendet.

Die in der Northern Blot-Analyse ermittelten steady state mRNA-Mengen sind deutlich unterschiedlich für einzelne Dg-Linien. Die drei Linien DgF 113, 114 und 127 zeigen keinerlei GUS steady state mRNA. Diese Linien hatten in der Southern Blot-Analyse keinerlei Hybridisierung mit einer GUS-Sonde oder ein aberrantes GUS-Fragment

aufgewiesen. Für alle weiteren vom Silencing des GUS-Gens betroffenen Linien zeigen sich zumindest geringe Mengen steady state GUS-mRNA oder aber vergleichsweise große steady state mRNA-Mengen des GUS-Gens, wie z. B. die Linien DgF 121 und DgR 106.

Die kolorimetrischen GUS-Aktivitätstests belegen, dass alle Dg-Linien von Silencing betroffen sind. Die zu erkennende Variabilität der GUS-Aktivität findet sich sowohl zwischen unabhängigen Linien als auch innerhalb einer Linie. Sogar einzelne Pflanzen weisen Blätter mit deutlich unterschiedlicher GUS-Aktivität auf, wie z. B. in den Linien DgR 106 und 107 sowie DgF 121.

Die in den kolorimetrischen GUS-Tests zu erkennende Variabilität macht deutlich, dass es je nach eingesetztem Blattmaterial in quantitativen GUS-Tests, Northern Blot-Analysen oder Experimenten zum Nachweis von siRNAs zu abweichenden Ergebnissen kommen kann. Daher ist die Korrelation der in diesen Experimenten erhaltenen Ergebnisse begrenzt. Im semiquantitativen GUS-Test zeigt die Linie DgR 111 keine Aktivität (Abb. 26). In der Northern Blot-Analyse weist diese Linie größere Mengen steady state mRNA auf als die Linie DgF 115, für die im semiquantitativen GUS-Test Aktivität zu erkennen ist.

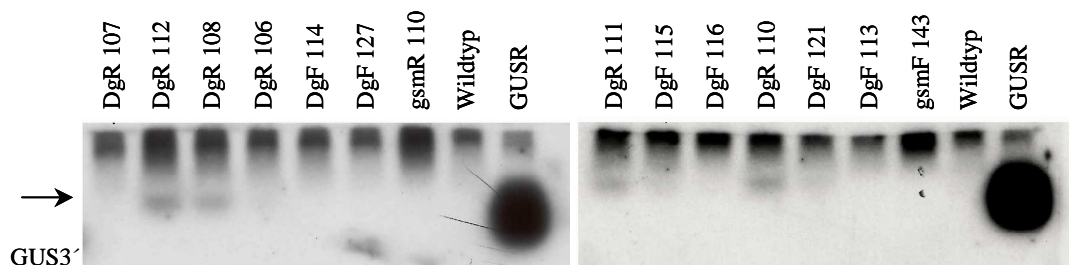


Abbildung 27: Nachweis von siRNAs des GUS-Gens in Linien der Dg-Population, die vom Silencing des GUS-Gens betroffen sind. Nachweis von GUS-siRNAs in Dg-Linien. Das verwendete Blattmaterial stammte von denselben Pflanzen, die auch das Blattmaterial für die Abb. 26 gezeigte Northern Blot-Analyse lieferten und wurde zum gleichen Zeitpunkt geerntet. Als Größenstandards dienten 75 ng des GUSR Oligonukleotids, gemischt mit 25 - 40 µg Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Es wurde jeweils die Hälfte einer Gesamt-RNA-Präparation eingesetzt (25 - 40 µg). Die Membran wurde mit einer GUS3'-Sonde hybridisiert. Die Signale der siRNAs sind durch einen Pfeil markiert. Die oberhalb aufleuchtenden Signale sind unspezifisch.

SiRNAs konnten für die Linien DgF 115 und 121, sowie für die Linien DgR 108, 110, 111 und 112 nachgewiesen werden (Abb. 27). Für die Linie DgR 106 konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Die Linien DgF 116 und R 107 zeigten keine siRNAs, ebenso wenig wie die Linien DgF 113, 114 und 127.

Eine komplette Auflistung der Ergebnisse aller anhand der Dg-Population durchgeführten Analysen findet sich in Tabelle 9.

Tabelle 9

Zusammenfassung der anhand der Linien der Dg-Population durchgeführten Analysen

Linie	GUS-Aktivität 4 Wochen alter Pflanzen	GUS-Aktivität 9 Wochen alter Pflanzen	Kolorimetrische GUS-Aktivitätstests 9 Wochen alter Pflanzen	Nachweis von siRNAs	Zahl der vorhandenen T-DNA Loci aberrante Segregationen	Maximale Zahl LB-flankierender Fragmente	Maximale Zahl RB-flankierender Fragmente	Intaktheit der GUS-Reportergen-kassette	Bemerkungen
Gruppe 1									
DgF 113	0	1.148	n.n.	nein	1	2	1	k.H.	
DgF 114	0	820	n.n.	nein	2+	3	2	k.H.	
DgF 127	179	348	n.n.	nein	2+	2	0	ab.	
Gruppe 2									
DgF 102	100.971	3.504	-		n.b.	3	3	ja + ab.	
DgF 110	311.425	114.354	+/-		1	2	1	ja	RB/RB IR
DgF 115	3.126	2.992	+/-	ja	2+	>7	>4	ja + ab.	
DgF 116	2.035	2.151	-	nein	2+	3	2	ja + ab.	
DgF 120	167.237	157.500	+/-		2+	5	5	ja	
DgF 121	656.203	534.158	+/-	ja	2+	3	3	ja	
DgF 122	772.607	417.232	+/-		2+	3	2	ja	
DgF 128	675.088	276.027	+/-		2+	2	1	ja	RB/RB IR
DgR 101	17.831	3.250	-		1	2	1	ja	RB/RB IR
DgR 102	335.628	262.878	+/-		1	2	1	ja	
DgR 105	252.531	393.628	+/-		2+	2	3	ja + ab.	
DgR 106	610.351	494.969	+/-	(ja)	2+	2	2	ja	
DgR 107	22.599	5.506	-	nein	1,1:1	2	1	ja	
DgR 108	3.704	611	-	ja	1	5	3	ja	
DgR 110	444.672	680.706	+/-	ja	1	2	2	ja	

DgR 111	25.707	6.331	-	ja	1	2	1	ja	
DgR 112	3.526	821	-	ja	1	4	3	ja	
Gruppe 3									
DgF 101	540.693	652.968	+		n.b.	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 106	298.885	512.727	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 107	357.473	538.324	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 108	370.971	765.791	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 109	261.483	622.373	+		1	1 + LB	1	ja	zusätzliches LB-Fragment
DgF 111	253.984	579.096	+		1,5:1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 112	302.200	459.161	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 117	336.118	478.598	+		1,8:1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 118	335.109	659.555	+		1	1 + LB	1	ja	zusätzliches LB-Fragment
DgF 119	383.456	586.664	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 123	381.312	489.408	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 124	476.298	861.653	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline
DgF 125	347.413	425.311	+		1	2	2	ja	
DgF 126	365.266	520.311	+		1,7:1	2	2	ja	
DgR 100	587.095	902.257	+		1	4	1	ja	
DgR 103	508.077	807.045	+		1	1	1	ab.	
DgR 104	429.865	714.350	+		1	2	1	ja	
DgR 109	405.963	568.191	+		1	1	1	ja	Einzelkopieline

Die dargestellten Ergebnisse wurden anhand der T1-Generation ermittelt, lediglich der Nachweis von siRNAs erfolgte in der T2-Generation. Quantitative GUS-Aktivität ist in [pmol 4-MU/min/mg Protein] angegeben. GUS-Aktivität im kolorimetrischen GUS-Aktivitätstest: n.n. = nicht nachweisbar, - = gering in allen Pflanzen, +/- = Variabilität, Pflanzen mit hoher und niedriger Aktivität, + = hoch in allen Pflanzen. Zahl der vorhandenen T-DNA Loci: n.b. = nicht bestimmbar, 2+ = 2 oder mehr vorhandene T-DNA Loci. Maximale Zahl LB-flankierender Fragmente: 1 + LB = neben einer kompletten T-DNA enthält die Linie zusätzlich ein Fragment der LB. Intaktheit der GUS-Reportergen-kassette: k.H. = keine Hybridisierung, ab. = Rearrangement der Reportergen-kassette. Bemerkungen: RB/RB IR = die Linie trägt eine invertierte Sequenzwiederholung zweier T-DNAs, wobei die rechten Grenzen der T-DNAs aneinander stoßen, Einzelkopieline = die Linien tragen lediglich eine vollständige T-DNA.

In der Untersuchung der mit dem Dg-T-DNA-Konstrukt transformierten Population sollte analysiert werden, welche Faktoren für die in transformierten Populationen beobachtete Variabilität verantwortlich sind. Wiederholte quantitative und kolorimetrische GUS-Tests belegten, dass die beobachtete Variabilität auf eine Inaktivierung des GUS-Gens zurückzuführen war. In der Gruppe von Pflanzen, die von dieser Inaktivierung des GUS-Gens betroffen war, konnte für 13 von insgesamt 17 Linien gezeigt werden, dass diese Inaktivierung im Verlauf der Entwicklung der Pflanzen einsetzte. Lediglich vier Linien (DgF 115, 116, DgR 108, 112, Tab. 9) wiesen bereits in vier Wochen alten Pflanzen sehr

niedrige Werte der GUS-Aktivität auf. Für drei dieser Linien (DgF 115, DgR 108, 112) konnte ein Nachweis von siRNAs des GUS-Gens erbracht werden. Beides zusammen deutet darauf hin, dass es sich bei der beobachteten Inaktivierung um posttranskriptionelles Silencing handelt. Lediglich die Linie DgF 116 zeigte weder Inaktivierung im Verlauf der Entwicklung, noch konnten siRNAs nachgewiesen werden. In der Northern Blot-Analyse zeigte sich für diese Linie Degradation der mRNA (Abb. 26). Evtl. ist dies ein Hinweis auf einen anderen Mechanismus der Inaktivierung des GUS-Gens in dieser Linie.

Die überwiegende Zahl der 17 Linien der Gruppe, in denen das GUS-Gen im Verlaufe der Entwicklung inaktiviert wird, geben durch die Zahl der LB- und RB-flankierenden Fragmente Hinweise auf eine erhöhte Zahl integrierter T-DNA Kopien an. Sechs Linien (DgF 110, 128, DgR 101, 102, 107, 111) wiesen lediglich ein RB- und zwei LB-flankierende Fragmente auf. Für drei dieser Linien (DgF 110, 128, DgR 101) zeigte die Analyse, dass diese Linien vermutlich einen IR tragen.

Umgekehrt deuten die Zahlen der LB- und RB-flankierenden Fragmente für die 18 Linien der Gruppe, die stabile GUS-Aktivität gezeigt hatten, überwiegend eine Integration lediglich einer T-DNA an. Ausnahmen stellen hier die Linien DgF 125, 126, DgR 100 und 104 dar, die erhöhte Zahlen der LB- und RB-flankierender Fragmente aufwiesen. Für 2 Linien konnte durch die Southern Blot-Analyse das Vorliegen von kleineren T-DNA Fragmenten nachgewiesen werden, die lediglich LB Sequenzen trugen (DgF 109 und 118). Ein Vergleich der Linien der Gruppen zwei und drei zeigt folglich eine Korrelation zwischen erhöhter Kopienzahl, angezeigt durch die Zahl der LB und RB-flankierenden Fragmente, und der Inaktivierung der GUS-Gene. Die Inaktivierung erfolgt in den meisten Fällen auf posttranskriptioneller Ebene.

Unter den 18 Linien mit stabiler Expression des GUS-Gens wurden 13 Einzelkopielinien identifiziert. 5 dieser Linien lagen in der T2-Generation homozygot für die T-DNA vor. Die GUS-Aktivität dieser Linien wurde quantitativ ermittelt. Die erhaltenen Werte waren vergleichbar zu Werten für Linien, die ebenfalls zwei Kopien des GUS-Gens tragen, wie z. B. gsm- (Abb. 3 C) oder gs-Linien (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 Expression des GFP-Reportergens in transgenen *A. thaliana* Linien

Für das GUS-Gen setzt Silencing bei gleichzeitiger Expression von drei Kopien unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors ein. Demgegenüber war für das GFP-Gen, ebenfalls unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, anhand der Linie mgfpR 127 eine stabile Expression von 4 Kopien nachgewiesen worden (Forsbach 2001). Diese Linie, die homozygot für eine invertierte Sequenzwiederholung zweier mgfpR T-DNAs ist, weist in quantitativen GFP-Fluoreszenzmessungen Werte auf, die etwa doppelt so hoch sind, wie sie für mgfp-Linien gemessen werden, die lediglich zwei GFP-Gene tragen (Abb. 29).

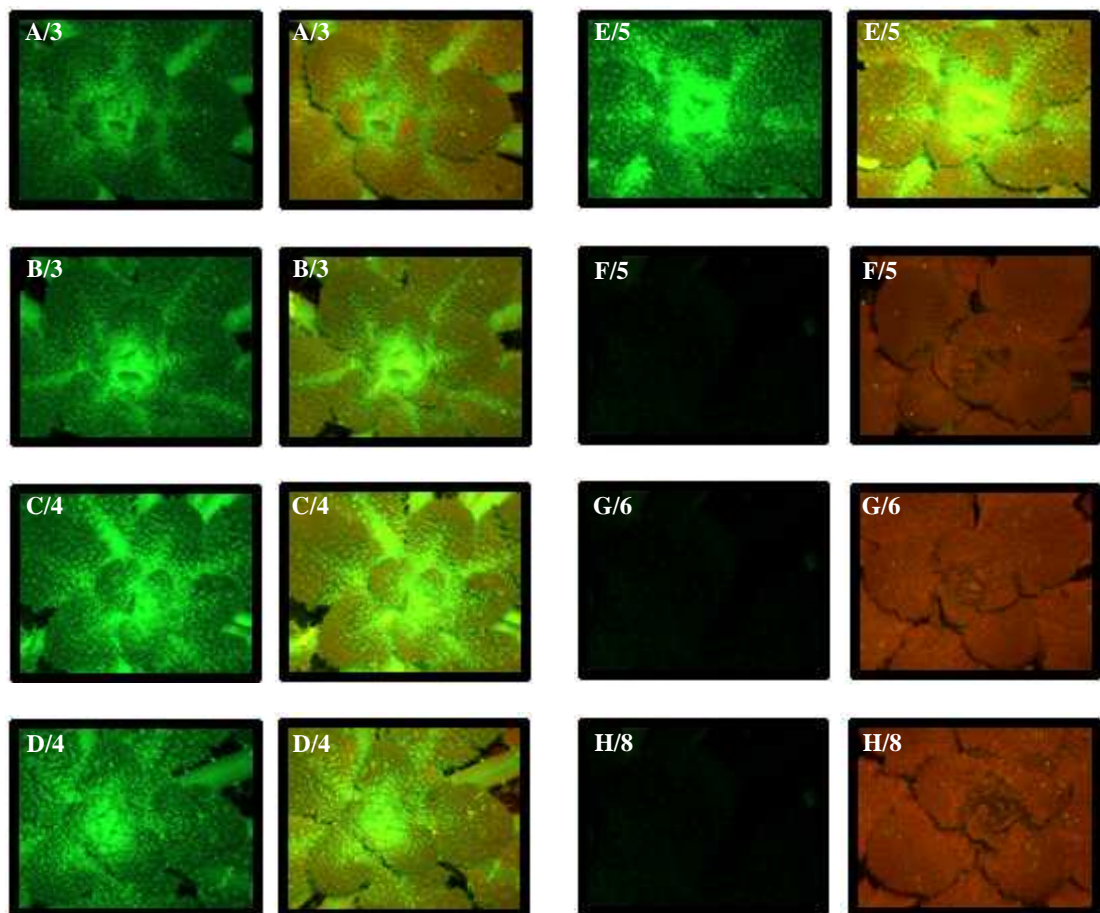


Abbildung 28: Verlust der GFP-Fluoreszenz bei gleichzeitiger Expression von 5 oder mehr Kopien des GFP-Gens. Alle Pflanzen waren Nachkommen sukzessiver Kreuzungen der Linien mgfpF 8 und 18 sowie der Linie mgfpR 127. Gezeigt sind Aufsichten auf die Rosetten der 9 Wochen alten Kreuzungsnachkommen 8/18/127-A bis H. Die Zahl der vorhandenen Kopien des GFP-Gens ist für die einzelnen Linien angegeben. Die Aufnahmen erfolgten unter identischen Bedingungen mit dem GFP2 (jeweils recht) und GFP3 Filter (jeweils links).

Anhand von Kreuzungsexperimenten sollte ermittelt werden, ob es auch beim GFP-Gen bei einer weiteren Erhöhung der Kopienzahl zum Silencing kommt. Es wurden sukzessive Kreuzungen zwischen verschiedenen mgfp-Einzelkopielinien und zusätzlich der IR-Linie mgfpR 127 durchgeführt. Die Abb. 28 zeigt ausgewählte Kreuzungsnachkommen.

Zunächst wurden die Linien mgfpF 8 und mgfpF 18 miteinander gekreuzt. Pflanzen, die für beide T-DNA Loci homozygot waren, wurden mit der IR-Linie mgfpR 127 gekreuzt. Mittels PCR-Experimenten wurde in den Pflanzen der T2-Generation die Zahl der vorhandenen T-DNAs bestimmt. Es konnten verschiedene Kreuzungsnachkommen identifiziert werden, deren GFP-Gene im Laufe ihrer Entwicklung inaktiviert wurden. Es zeigte sich, dass diese 5 oder mehr Kopien des GFP-Gens trugen. Vorliegen von 5 GFP-Kopien führte nicht zwangsläufig zum Silencing dieses Reportergens. Während die Pflanze mgfp 8/18/127-E GFP-Fluoreszenz zeigt, hat die Pflanze mgfp 8/18/127-F diese verloren. Die Pflanzen 8/18/127-G und -H mit 6 bzw. 8 GFP-Kopien besitzen ebenfalls keine GFP-Fluoreszenz. Linien mit 3 oder 4 Kopien des GFP-Gens wie die Pflanzen 8/18/127-A bis -D wiesen durchweg GFP-Fluoreszenz auf. Alle Aufnahmen in Abb. 28 wurden mit identischen Einstellungen gemacht. Daher können sie direkt miteinander verglichen werden. Die Zunahme der Fluoreszenz bei Vorliegen von 3, 4 und 5 GFP-Kopien deutet auf einen positiven Gendosisseffekt hin. In weiteren Experimenten wurden die drei Einzelkopielinien mgfpF 8 und 128 sowie die Linie mgfpR 111 sukzessive miteinander gekreuzt. Unter den Kreuzungsnachkommen wurden zwei Pflanzen identifiziert, die für alle drei T-DNA-Loci homozygot waren und folglich 6 Kopien des GFP-Gens trugen. Beide Pflanzen zeigten Silencing des GFP-Gens (Daten nicht gezeigt).

Im folgenden wurde ein transgene *A. thaliana* Population untersucht, deren Mitglieder mit den mgfp-T-DNA-Konstrukten transformiert worden waren (mgfp-Population). Es sollte analysiert werden, ob auch hier, wie in der Dg-Population, in einigen Linien Inaktivierung des Transgens vorlag. Ausserdem sollte ermittelt werden, welcher Mechanismus einer möglichen Inaktivierung zugrunde lag. Die mgfp-Population umfasste 78 unabhängige Linien. Innerhalb dieser Population waren bereits 8 Einzelkopielinien identifiziert worden, sowie die IR-Linie mgfpR 127.

Für die Pflanzen der 78 mgfp-Linien wurden quantitative GFP-Fluoreszenzmessungen im Alter von 2, 5 und 8 Wochen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 29 für ausgesuchte Linien dargestellt.

Für 15 Linien wurden sowohl in 2, 5 und 8 Wochen alten Pflanzen GFP-Fluoreszenzwerte ermittelt, die auf dem Niveau des Wildtyps lagen (Daten nicht gezeigt). In einer

durchgeführten Southern Blot-Analyse zeigte keine dieser 15 mgfp-Linien eine Hybridisierung mit einer Sonde aus GFP-Sequenzen. Diese Linien trugen offensichtlich kein GFP-Gen.

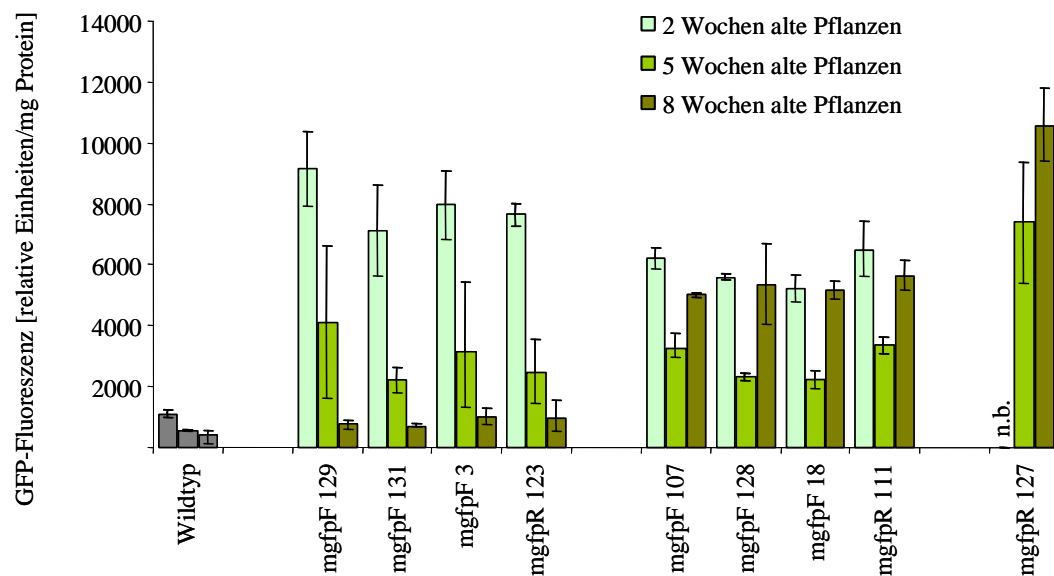


Abbildung 29: Inaktivierung des GFP-Gens in vier Linien der mgfp-Population. Ergebnisse quantitativer GFP-Fluoreszenzmessungen 2, 5 und 8 Wochen alter Pflanzen. Als Kontrolle dienen *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen, die Einzelkopielineien mgfpF 107, 128, 18 und mgfpR 111 sowie die IR-Linie mgfpR 127. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Für 59 mgfp-Linien zeigte sich in 2, 5 und 8 Wochen alten Pflanzen stabile Expression des GFP-Gens und somit keinerlei Hinweis auf eine Inaktivierung des GFP-Gens. Für die bereits etablierten homozygoten Einzelkopielineien (z.B. mgfpF 18, 107, 128 und mgfpR 111 in Abb. 29) lagen die ermittelten GFP-Fluoreszenzwerte in 8 Wochen alten Pflanzen z.B. zwischen 5235 und 9091 [relative Einheiten Fluoreszenz/mg Protein]. Die Pflanzen der IR-Linie mgfpR 127 wiesen im Alter von 8 Wochen einen Wert von 11414 [relative Einheiten Fluoreszenz/mg Protein] auf (Abb. 29). Alle übrigen Linien mit stabiler GFP-Aktivität wiesen GFP-Fluoreszenzwerte auf die zwischen 2569 und 12462 [relative Einheiten Fluoreszenz/mg Protein] lagen. Die maximal in der Population gemessenen Werte lagen folglich nicht wesentlich über denen, die in der IR-Linie mgfpR 127 mit vier Kopien des GFP-Gens ermittelt wurden.

Lediglich 4 der 78 Linien der mgfp-Population zeigten in den quantitativen GFP-Tests einen deutlichen Rückgang der GFP-Fluoreszenz, wie in Abb. 29 zu erkennen ist. Während 2 Wochen alte Pflanzen noch recht hohe Fluoreszenzwerte aufgewiesen hatten, zeigten 8

Wochen alte Pflanzen lediglich Werte, die auf dem Niveau der im Wildtyp gemessenen Werte lagen. In den Linien mgfpF 3, 129 und 131 sowie die Linie mgfpR 123 erfolgte die Inaktivierung des GFP-Gens also im Verlauf der Entwicklung. Anhand von 8 Wochen alten Pflanzen durchgeführte Northern Blot-Experimente bestätigten die Inaktivierung durch den Nachweis drastisch reduzierter steady state mRNA-Mengen des GFP-Gens in diesen Linien (Daten nicht gezeigt).

Um den Mechanismus der Inaktivierung in den Linien mgfpF 3, 129 und 131 sowie die Linie mgfpR 123 zu untersuchen, wurden Experimente zum Nachweis GFP-Gen-spezifischer siRNAs unternommen. Das Ergebnis ist in Abb. 30 zu sehen.

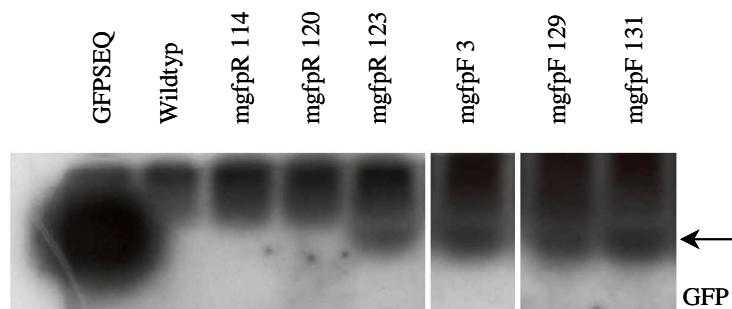


Abbildung 30: Nachweis von siRNAs in den vier mgfp-Linien, die in quantitativen GFP-Fluoreszenzmessungen Inaktivierung des GFP-Gens gezeigt hatten. Die zusätzlich gezeigten Linien mgfpR 114 und 120 hatten in den durchgeführten quantitativen Tests stabile GFP-Fluoreszenz gezeigt. Als Größenstandards dienten 75 ng des GFPSEQ Oligonukleotids, gemischt mit 50 - 70 µg Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen. Es wurde jeweils die Hälfte einer kompletten Gesamt-RNA-Präparation eingesetzt (50 - 70 µg). Die Membran wurde mit einer GFP-Sonde hybridisiert. Die Signale der siRNAs sind durch einen Pfeil markiert. Die oberhalb aufleuchtenden Signale sind unspezifisch.

Für alle vier von Silencing betroffenen mgfp-Linien konnte der Nachweis von GFP-Gen-spezifischen siRNAs geführt werden.

Die Analyse des GFP-Gens in transgenen *A. thaliana* Linien belegte, dass es auch bei diesem Reportergen mit Erhöhung der Kopienzahl zum Silencing kommt. Die Zahl der Kopien, ab der eine Inaktivierung erfolgt, liegt bei 5 bzw. 6. Die Feststellung, dass in den Linien einer transgenen Population maximal Fluoreszenzwerte ermittelt wurden, die nur geringfügig über den Werten lagen, die in einer Linie mit 4 Kopien des GFP-Gens festgestellt wurden, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass nicht viel mehr als 4 Kopien des GFP-Gens gleichzeitig unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in *A. thaliana* exprimiert werden können.

Für die vier Linien, die in den quantitativen GFP-Tests und der Northern Blot-Analyse eine Inaktivierung des GFP-Gens aufgewiesen hatten, konnte durch den Nachweis von GFP-Gen-spezifischen siRNAs posttranskriptionelles Silencing des GFP-Gens nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Die Expression von Transgenen in *A. thaliana*

4.1.1 Gleichzeitige stabile und koordinierte Expression dreier unterschiedlicher Transgene in *A. thaliana*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl zwei als auch drei unterschiedliche Reportergene, alle unter der Kontrolle des starken und konstitutiven CaMV 35S-Promotors, koordiniert, stabil und vergleichsweise hoch in *A. thaliana* exprimiert werden können (3.2.1). Die Expression der einzelnen Reportergene war vergleichbar zwischen unabhängigen transgenen Linien und Pflanzen unterschiedlicher Generationen. Die unterschiedlichen Reportergene beeinflussten sich nicht gegenseitig in ihrer Expression (3.2.1, Abb. 3). Für das GUS- und SPT-Gen lagen die steady state mRNA-Mengen in einer vergleichbaren Größenordnung, wobei die steady state m-RNA-Menge des SPT-Gens lediglich 2 – 3-fach größer als die des GUS-Gens war (3.2.1, Abb. 2).

Ab einer, für jedes Reportergen unterschiedlichen Zahl von exprimierten Kopien unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors kam es allerdings zum Silencing. Gleichfalls anwesende Reportergene, die Sequenzhomologien zu dem inaktivierten Reportergen trugen, wurden dann ebenfalls inaktiviert (3.4.1).

Die koordinierte Expression zweier oder mehrerer Transgene ist aus biotechnologischer Sicht von großem Interesse. Dadurch können Pflanzen mit kompletten oder einzelnen aufeinander folgenden Schritten, ihnen fremder Stoffwechselwege ausgestattet werden. Oft sind mehrere enzymatische Schritte auf dem Weg zu neuen Eigenschaften erforderlich.

Das Einbringen mehrerer Transgene kann auf unterschiedlichen Wegen geschehen: (1) durch sukzessive Kreuzungen unterschiedlicher transgener Individuen (Nawrath *et al.* 1994), (2) durch Vereinen aller gewählten Gene auf einer einzigen, zur Transformation verwendeten DNA-Sequenz (Jach *et al.* 1995, Leech *et al.* 1998) oder (3) durch gleichzeitige Transformation mehrerer Plasmide (Chen *et al.* 1998, Maqbool und Christou 1999). Biotechnologisch ist vor allem die Modifikation von Nutzpflanzen von Bedeutung. So wurde z. B. versucht, drei Gene des Provitamin A (β -Karotin) Stoffwechsels im Reisendosperm zu exprimieren, um das ansonsten karotinfreie Endosperm mit Provitamin A anzureichern (Ye *et al.* 2000). In einem weiteren interessanten Ansatz sollten

aliphatische Polyester mit thermoplastischen Eigenschaften in Pflanzen synthetisiert werden (Nawrath *et al.* 1994). Poly[(R)-(-)-3Hydroxybutyrat] wäre als erneuerbarer, biologisch abbaubarer Rohstoff für die Plastikindustrie von Interesse. Um Acetyl-CoA in Poly[(R)-(-)-3Hydroxybutyrat] umzuwandeln, wurden in dieser Untersuchung drei Transgene in *A. thaliana* eingebracht. Koordinierte, stabile Expression der Transgene konnte in den beiden angesprochenen und auch in weiteren Untersuchungen nur vereinzelt erreicht werden (Dean *et al.* 1988a, Peach und Velten 1991, Maqbool und Christou 1999). Transgene Tabakpflanzen, die ein Tryptophan-Decarboxylase (*tdc*) und ein Strictosidin-Synthase (*str1*) Transgen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors trugen, zeigten in über 50 % der Fälle Inaktivierung eines der beiden oder beider Transgene (Leech *et al.* 1998). In den Pflanzen mit nachweisbarer TDC- und STR1-Aktivität zeigten sich für das Enzym TDC maximal 24-fache und für das Enzym STR1 maximal 110-fache Unterschiede in der Aktivität. Hinzu kam, dass das Verhältnis beider Enzymaktivitäten deutlich unterschiedlich in verschiedenen Pflanzen war. Nur in Ausnahmefällen zeigte sich eine koordinierte Expression verschiedener Transgene. Gidoni *et al.* (1988) konnte dies für die Petuniengene *CAB22L* und *CAB22R*, die in Tabak transformiert worden waren, nur dann erreichen, wenn ihre natürliche Anordnung innerhalb einer DNA-Sequenz erhalten blieb. Als mögliche Ursachen für die beobachtete Variabilität wurden unter anderem Einflüsse der chromosomalen Umgebung, die Kopienzahl der Transgene, Rearrangements der Transgen-DNA oder durch DNA/DNA Wechselwirkungen vermittelte Inaktivierung der Transgene vorgeschlagen (Maqbool und Christou 1999). Die in der vorliegenden Arbeit erreichte stabile und koordinierte Expression zweier oder dreier Transgene in 27 unabhängigen Linien machen den Einfluss der chromosomalen Umgebung eher unwahrscheinlich, da alle Transformanten eine Expression des jeweiligen Reportergens auf vergleichbarem Niveau zeigten (3.2.1, Abb. 3). Durch DNA/DNA Wechselwirkungen vermittelte Inaktivierung scheint ebenso unwahrscheinlich, da sechs Kopien des CaMV 35S-Promotors, die in für die T-DNA homozygoten *gsm*-Linien vorliegen, die Expression nicht beeinflussten. Schubert (2002) konnte belegen, dass sechs Kopien des SPT-Gens unter Kontrolle des CaMV 35s-Promotors stabil und hoch in *A. thaliana* exprimiert werden können.

Um koordinierte Transgenexpression zu erreichen, wurden bereits verschiedene Ansätze vorgeschlagen. Dies waren beispielsweise die Verwendung bicistronischer Transkriptionseinheiten (Lough *et al.* 1997), selbstprozessierender Polyproteine (Dasgupta *et al.* 1998, Halpin *et al.* 1999), bifunktionaler Proteine (Elmayan und Tepfer 1994) oder

die Verwendung Kernmatrix-assoziiierter Sequenzen zur Flankierung der Transgene (Mlynarova *et al.* 2002). Alle diese Techniken sind vergleichsweise arbeitsaufwendig. Die vorliegende Arbeit zeigt hingegen unzweifelhaft, dass eine koordinierte und verlässliche Transgenexpression in *A. thaliana* selbst dann möglich ist, wenn drei unterschiedliche, hochexprimierte Transgene in repetitiver Anordnung und unter der Kontrolle des gleichen starken Promotors auf einer T-DNA vereint sind.

4.1.2 Einflüsse auf die Expression von Transgenen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors in *A. thaliana*

Die zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten anhand derselben Pflanzen ermittelten GUS-Aktivitäts- und GFP-Fluoreszenzwerte zeigten ca. 2,5-fache Unterschiede (3.2.1, Tab. 3). Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die untersuchten Pflanzen zunächst in Sterilkultur auf Agar-Medium angezogen und im Alter von zwei Wochen in Erde überführt. Es konnte nicht unterschieden werden, ob die vergleichsweise niedrige Reporterexpression in fünf Wochen alten Pflanzen spezifisch für diese Wachstumsbedingungen war oder aber spezifisch für die Entwicklung von *A. thaliana* ist. Dass sie GUS- und GFP-Gen in gleicher Weise betrafen, belegt erneut deren koordinierte Expression bzw.

Eine wichtige Schlussfolgerung, die aus der beobachteten Variabilität der Reporterexpression gezogen werden kann, ist, dass quantitative Vergleiche für die Expression eines Transgens in unterschiedlichen Pflanzen nur dann sinnvoll sind, wenn die Werte unter identischen Bedingungen ermittelt wurden. Nur so können Unterschiede in der Expression eines Reportergens, die geringer sind als die durch die experimentellen Bedingungen gegebene Variabilität, untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit sind dies der positive Gendosiseffekt für das GUS- und GFP-Gen (3.2.1, Abb. 4) und die um 20 - 25 % unterschiedliche Expression der Reportergene in Linien mit R- oder F-Orientierung der Reportergene (3.2.1, Abb. 5).

Für die Beobachtung, dass Linien mit R-Orientierung der Reportergene gegenüber Linien mit F-Orientierung eine 20 - 25 % höhere Expression derselben aufweisen, könnten richtungsabhängige Enhancer- oder Silencer-Effekte von Sequenzen der verwendeten T-DNAs verantwortlich sein. Der Einfluss von Fragmenten des nos3'-Endes und CaMV 35S-Promotors auf die Expression eines unter der Kontrolle des pnos-Promotors stehenden GUS-Gens wurde in transgenen Tabak-Kalli untersucht (Breyne *et al.* 1992).

Vergleichsweise hohe GUS-Aktivität zeigte sich in dieser Untersuchung für Reportergene, die, in Analogie zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten, eine R-Orientierung aufwiesen und bei denen die T-DNA zwischen pnos-Promotor und RB zusätzlich ein Fragment des CaMV 35S-Promotors oder des nos3'-Endes trugen. Ansonsten identische T-DNAs, deren GUS-Gen in umgekehrter Richtung transkribiert wurde (F-Orientierung), führten zu vergleichsweise niedriger GUS-Aktivität. Enhancer-Effekte des CaMV 35S-Promotors wurden auch in anderen Untersuchungen gefunden (Benfey *et al.* 1989, Koncz *et al.* 1989). Für Sequenzen des Mannopinsynthese-Promotors (p1') zeigten sich nicht nur aktivierende, sondern auch inhibierende Effekte auf einen rudimentären CaMV 35S-Promotor (Guevara-Garcia *et al.* 1999). Diese waren Richtungsabhängig.

Die Analyse von 5, für die T-DNA homozygoten Dg-Einzelkopielinien, ergab GUS-Aktivitätswerte die vergleichbar zu denjenigen anderer Linien waren, die ebenfalls zwei GUS-Gene sowie ein *Ds*-Element, den p1'-Promotor, das HPT-Gen und das nos3'-Ende tragen (3.1, Abb. 1). Dies belegt, dass kein grundlegender Einfluss der Größe der T-DNA bzw. der genannten Komponenten auf die Expression der Reportergene besteht. Eine differenzierte Analyse weiterer DgF- und DgR-Linien könnte zeigen, ob p1'-Promotor, das nos3'-Ende oder aber auch das HPT-Gen bzw. das *Ds*-Element für die Unterschiede der Expression in Linien mit F- bzw. R-Orientierung der Reportergen verantwortlich sind.

4.1.3 Der Einfluss des Integrationsortes auf die Expression von Transgenen

Unabhängige Linien, deren GUS-Gene unter der Kontrolle des pnos-Promotors standen, zeigten bis zu 23-fache Unterschiede in der GUS-Aktivität (3.3.1, Abb. 7). Dies ist deutlich mehr als in unabhängigen Linien gefunden wurde, deren GUS-Gene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor standen. Hier wurden maximal 3,5-fache Unterschiede ermittelt (3.2.1, Abb. 4, Tab. 3). In den untersuchten pg-Linien zeigte sich außerdem keine Korrelation zwischen der Zahl vorliegender GUS-Kopien und ihrer Expression (3.3.1, Abb. 7).

In unabhängigen transgenen Tabak-Kalli, die eine pgR-ähnliche T-DNA trugen, war vergleichbar hohe Variabilität in Bezug auf die Expression des Reportergens gefunden worden (Breyne *et al.* 1992). Die hier vorliegende Arbeit konnte belegen, dass es sich dabei nicht um zufällige oder von externen Faktoren verursachte Variabilität in der GUS-Aktivität handelte. Vielmehr besitzen unabhängige pg-Linien stabile GUS-Aktivität auf unterschiedlichen Niveaus (3.3.1, Abb. 8). Als wahrscheinlichste Ursache für diese

linienspezifischen Unterschiede kann der Einfluss der chromosomalen Umgebung angenommen werden. So könnten in der Umgebung befindliche regulatorische Elemente wie Enhancer oder Silencer Einflüsse auf den pnos-Promotor ausüben. Untersuchungen mit „Promoter- oder Enhancer-Trap“-T-DNAs zeigten, dass die Integration eines niedrig exprimierten Transgens in der Nähe eines starken pflanzlichen Promotors oder Enhancers die Expression des Transgens erhöhen kann (Topping *et al.* 1994, Klimyuk *et al.* 1995). Die Vermutung, dass regulatorische Elemente für die linienspezifischen Expressionsunterschiede in den pg-Linien verantwortlich sind, wird zusätzlich dadurch bekräftigt, dass in einer Untersuchung zur T-DNA-Insertion im *A. thaliana* Genom ca. 25 % aller Insertionen in dem Bereich 500 bp oberhalb des Transkriptionsstarts gefunden wurden (Forsbach *et al.* eingereicht zur Veröffentlichung), und damit eine Präferenz für diese Bereiche gezeigt wurde.

Der Einfluss der chromosomalen Umgebung auf die Expression von Transgenen, die unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehen, scheint demgegenüber eher gering, wie die vergleichsweise geringe Variabilität der Reporterexpression in diesen Linien belegt (3.2.1, Abb. 4, Tab. 3). Die Bestimmung der genomischen Bereiche, die die T-DNAs flankieren, zeigte für 31 Linien, deren Reportergene unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors stehen, eine Verteilung der T-DNA-Integrationen über alle 5 *A. thaliana*-Chromosomen (Tab. 1, Forsbach 2001). Der Einfluss der chromosomalen Umgebung auf die Expression von Reportergenen, die unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors standen, erwies sich auch in anderen Untersuchungen als eher gering (Lechtenberg 1999, Gils 2000, Forsbach 2001, Schubert 2002).

Weder in diesen Untersuchungen, noch in der vorliegenden Arbeit konnte für *A. thaliana* ein zum Positionseffekt in *D. melanogaster* vergleichbares Phänomen nachgewiesen werden. So wurden z.B. zwei T-DNA-Integrationen in heterochromatischen Bereichen in Centromernähe identifiziert, die stabile Expression des eines GUS-Reportergens aufwiesen (Forsbach *et al.* eingereicht zur Veröffentlichung). In *D. melanogaster* kommt es gleichzeitig mit der Bildung von Heterochromatin zur Inaktivierung der dort befindlichen Gene (zusammengefasst in Karpen 1994).

Enhancer- und Silencer-Effekte könnten einerseits spezifisch auf den pnos-Promotor wirken und würden dementsprechend beim CaMV 35S-Promotor nicht zum Tragen kommen. Andererseits könnte es sich um additive Effekte handeln, deren Wirkung auf den durchschnittlich 300-fach stärkeren CaMV 35S-Promotor (3.3.1) zu gering sind, um bei dessen hohen Transkriptionsraten nachgewiesen werden zu können.

4.2 Die Inaktivierung von Transgenen in *A. thaliana*

4.2.1 Evidenzen für einen transkriptionellen Schwellenwert als Auslöser von RNA-Silencing

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kreuzungsexperimente konnten zeigen, dass die Inaktivierung des GFP-Gens bei gleichzeitiger Expression von 5 oder mehr Kopien unter der Kontrolle des 35S-Promotors erfolgt (3.6.2, Abb. 28). Allerdings zeigten nicht alle Pflanzen, die 5 Kopien des GFP-Gens trugen, dessen Inaktivierung. Auch in den gsg-Linien, die vier Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des 35S-Promotors tragen, zeigten vereinzelte Pflanzen nach 8 Wochen noch GUS-Aktivität (3.4.1, Abb. 9). Daraus wird deutlich, dass nicht die Zahl der GFP- oder GUS-Kopien für deren Inaktivierung entscheidend ist. Verantwortlich könnte vielmehr ihre Gesamttranskription sein (Schwellenwert-Modell) (Dehio und Schell 1994, Vaucheret *et al.* 1998, Schubert 2002).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden des weiteren Beispiele vorgestellt, in denen Linien, die lediglich je zwei Kopien der Reportergene tragen, von Silencing betroffen waren (3.4.5, Abb. 19). Diese Inaktivierung wurde nur in 7 oder mehr Wochen alten Pflanzen, und überwiegend in Linien mit R-Orientierung der Reportergene beobachtet. Eine vergleichsweise höhere Expression der Reportergene wird sowohl in älteren Pflanzen (3.2.1, Abb. 4) als auch in Linien, die Transgene in R-Orientierung tragen, beobachtet (3.2.1, Abb. 5). Daher könnte die Gesamttranskriptmenge für das jeweilige Reportergen in diesen Linien näher und vereinzelt über der postulierten Schwelle liegen.

Weiterer Beleg dafür, dass nicht die Kopienzahl, sondern die Gesamttranskription mit der Inaktivierung der Reportergene korreliert, ist die Tatsache, dass Nachkommen von Kreuzungen von pg- mit gsg-Linien, trotz Expression von 4 Kopien des GUS-Gens kein Silencing zeigen (3.4.3, Abb. 17). Zwei gering exprimierte Kopien unter der Kontrolle des pnos-Promotors tragen nicht ausreichend zur Gesamttranskription bei, um den Schwellenwert zu erreichen, ab dem es zur Inaktivierung der Transgene kommt.

Insgesamt konnte die vorliegende Arbeit somit weitere wichtige Hinweise für das Schwellenwert-Modell (Dehio und Schell 1994, Vaucheret *et al.* 1998, Schubert 2002) erbringen.

4.2.2 Untranslatierbare mRNA in Linien, die Silencing des GUS-Gens zeigen

RNA-Silencing von GUS-Genen unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors führt nicht zum völligen Verlust der GUS steady state mRNA (3.4.1, Abb. 10). Auch in quantitativen GUS-Tests bleibt weiterhin Aktivität nachweisbar. Die GUS-Aktivität in gsg-Linien, die von Silencing betroffen sind, ist vergleichbar mit derjenigen von Linien, deren GUS-Gene unter der Kontrolle des pnos-Promotors stehen und die stabile GUS-Aktivität aufweisen. Demgegenüber unterscheiden sich ihre steady state mRNA-Mengen erheblich (3.4.2, Abb. 13). Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass ein Teil der steady state GUS-mRNA in von Silencing betroffenen Linien entweder gar nicht oder nur verlangsamt translatiert wird. In einer anderen Untersuchung zeigte sich für ein inaktiviertes NPT-Transgen, dass keine Korrelation zwischen der vorhandenen steady state mRNA-Menge und der verbliebenen Proteinmenge vorhanden war (Van Houdt *et al.* 1997).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Northern Blot-Analyse konnte für Linien, die Silencing zeigten, keine Veränderung der Größe der GUS-mRNA nachweisen (3.4.2, Abb. 13). Der Verlust kleinerer Bereiche wie z. B. Teilen des Polyadenylierungssignals am 3'-Ende oder der 7-Monomethyl-Guanosin-Kappe am 5'-Ende kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Beide Strukturen sind wichtige Determinanten für eine effektive Translation von mRNA (Gallie 1998).

Im Zuge des Silencings des GUS-Gens könnte es auch zu anderen strukturellen Veränderungen der GUS-mRNA kommen, die diese für eine effektive Translation ungeeignet machen. In jedem Fall müssen diese Veränderungen spezifisch für die GUS-mRNA sein. Die Spezifität könnte von siRNAs vermittelt werden. Von Vaistij *et al.* (2002) wurde vorgeschlagen, dass eine Interaktion zwischen *antisense* siRNAs und *sense* mRNA letztere strukturell verändert und damit für eine RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRP) zugänglich macht. Dies könnte die effektive Translation der *sense* mRNA verhindern.

4.2.3 Übertragung des Silencings

Linien, die drei oder mehr Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors tragen, zeigen Silencing dieses Reportergens (Lechtenberg 1999, Gils 2000, Forsbach 2001, Schubert 2002). Durch den Nachweis von siRNAs konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass diesem Silencing ein posttranskriptioneller Mechanismus zugrunde liegt (3.4.1, Abb. 11).

Vermutlich in Folge der Inaktivierung des GUS-Gens kommt es in Pflanzen, die zusätzlich SPT- und GFP-Gene tragen, welche in den transkribierten Bereichen eine partielle Sequenzhomologie zum GUS-Gen aufweisen, zur Reduktion ihrer steady state mRNA-Mengen (3.4.1, Abb. 10 und 12). GUS- und SPT- bzw. GFP-Gene können sich dabei an gleichen oder an unterschiedlichen Loci befinden. Für das SPT-Gen zeigte sich nicht nur Reduktion der mRNA Mengen, sondern zusätzlich ein verkürztes Transkript (3.4.1, Abb. 12). Auch in *gsm*-Linien, die lediglich je zwei Kopien der Reportergene tragen und nur in Ausnahmefällen von Silencing betroffen waren, zeigten alle Reportergene Inaktivierung (3.4.5, Abb. 19).

In der Literatur ist eine Übertragung von Silencing mehrfach beschrieben (Lindbo *et al.* 1993, Ruiz *et al.* 1998, Vaistij *et al.* 2002). Voraussetzung für eine Übertragung sind Sequenzhomologien in transkribierten Bereichen der beteiligten Loci. Über homologe, transkribierte Sequenzen wird z. B. das sogenannte Virus-induzierte Gen-Silencing (VIGS) vermittelt. Werden Pflanzen mit rekombinanten Viren infiziert, die in ihrem Genom Sequenzen mit Homologie zu endogenen Genen der Wirtspflanze enthalten, so werden gleichzeitig zum RNA-Silencing der Virussequenzen auch die entsprechenden endogenen Gene inaktiviert (Lindbo *et al.* 1993, Ruiz *et al.* 1998). Auch Transgene können in analoger Weise inaktiviert werden. Hierbei können bereits identische Fragmente von 23 Nukleotiden Länge für erfolgreiches RNA-Silencing von Transgenen ausreichen (Thomas *et al.* 2001). Auch die Kosuppression endogener Gene durch die gleichzeitige Expression von Transgenen basiert auf Sequenzhomologien in transkribierten Bereichen. Kosuppression erfordert nicht unbedingt die Transkription einer Vollängen mRNA. Silencing des Gens der Chalkonsynthase in Petunie konnte sowohl durch Expression einer Vollängen-cDNA (1334 bp) als auch durch Expression eines 5'- (772 bp) oder eines 3'-Fragmentes (608 bp) erreicht werden (van Blokland *et al.* 1994). Die Expression einer fusionierten Sequenz aus 244 bp des 5'-Endes einer Polygalakturonase-cDNA und 1320 bp eines internen Fragmentes einer Pektinase-cDNA führten zur Kosuppression beider endogenen Gene (Seymour *et al.* 1993).

Auch die Reduktion der SPT- und GFP steady state mRNA-Mengen wird vermutlich über identische transkribierte Sequenzen vermittelt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Reportergenkassetten tragen die Sequenzen des Ω -„leaders“ und des ocs3'-Endes. Für den Ω -„leader“ kann Transkription vorausgesetzt werden, für das ocs3'-Ende wurde diese durch Northern Blot-Experimente belegt (3.4.1, Abb. 10).

Für den Mechanismus, der zur Reduktion der SPT- und GFP steady state mRNA-Mengen führt, gibt es mehrere Möglichkeiten.

Experimente in *D. melanogaster* belegen, dass siRNAs ein Abbauprodukt bei der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi) sind (Zamore *et al.* 2000). Bei RNAi handelt es sich um einen posttranskriptionellen Inaktivierungsmechanismus, der dem RNA-Silencing in Pflanzen sehr ähnlich ist (zusammengefasst in Zamore 2001). Der Nachweis von siRNAs des ocs3'-Endes deutet an, dass diese Sequenz in Pflanzen, die von Inaktivierung der vorliegenden Reportergene betroffen sind, dem posttranskriptionellen Abbau unterliegt (3.4.1, Abb. 11). Aus *D. melanogaster* wurde ein an RNAi beteiligter, sogenannter „RNA-induzierter Silencing-Komplex“ (RISC) isoliert (Hammond *et al.* 2000). Experimente legen nahe, dass dieser Komplex in der Lage ist, siRNAs zu binden (Hammond *et al.* 2000) und zu diesen siRNAs homologe mRNA-Sequenzen endonukleolytisch zu spalten (Zamore *et al.* 2000, Elbashir *et al.* 2001). Ein vergleichbarer, in Pflanzen vorliegender, Komplex könnte für einen Abbau der ocs3'- und evtl. zusätzlich der Ω-„leader“-Sequenzen in den SPT- und GFP-Transkripten verantwortlich sein. Durch Abbau der ocs3'- und evtl. zusätzlich der Ω-„leader“- Sequenz würden SPT- und GFP-mRNA das Polyadenylierungssignal am 3'-Ende und evtl. die 7-Monomethyl-Guanosin-Kappe am 5'-Ende verlieren. Beide Strukturen sind wichtig für die Stabilität von mRNA (Abler und Green 1996) und ein Fehlen könnte, wie in *S. cerevisiae* gezeigt, zu einem raschen Abbau der mRNA durch Exonukleasen führen (Caponigro und Parker 1996). Das zusätzliche auftretende, verkürzte SPT-Transkript könnte ein Zwischenprodukt dieses Abbaus sein. Han und Grierson (2002) konnten für ein posttranskriptionell inaktiviertes Polygalacturonasegen in Tomate ebenfalls verkürzte Transkripte nachweisen. Die Stelle, an der die verkürzten Transkripte geschnitten waren, befand sich in einer Sequenz, für die besonders große Mengen siRNAs nachgewiesen werden konnten.

Alternativ, bzw. parallel dazu könnte der Abbau der SPT- und GFP-Transkripte auch durch eine siRNA-vermittelte Erzeugung von dsRNAs der ocs3'- und evtl. zusätzlich der Ω-„leader“-Sequenzen erfolgen. Für die Synthese der zu den *sense* mRNA Sequenzen des ocs3'-Endes und evtl. zusätzlich des Ω-„leaders“ komplementären RNA-Stränge wäre eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) verantwortlich. In *C. elegans* konnte der Beweis erbracht werden, dass siRNAs sowohl Abbauprodukt als auch „Primer“ für eine RdRP-vermittelte Synthese von dsRNA sind (Sijen *et al.* 2001). In *A. thaliana* konnte durch Isolierung einer Mutante die Beteiligung einer RdRP an Transgen-Silencing

nachgewiesen werden (Dalmay *et al.* 2000, Mourrain *et al.* 2000). Die so erzeugte dsRNA könnte dem Abbau durch dsRNAsen unterliegen. In *D. melanogaster* konnte eine ATP-abhängige Endonuklease („Dicer“) identifiziert werden, die dsRNAs zu siRNAs abbaut (Bernstein *et al.* 2001). Eine Mutation im orthologen Gen aus *A. thaliana* (*carpel factory*) führt zu erheblichen morphologischen Defekten (Jacobsen *et al.* 1999). Die Beobachtung, dass gsg-Linien im unmittelbaren Vergleich zu g3R-Linien bei gleichen Mengen GUS-siRNAs größere Mengen ocs3'-siRNAs aufweisen, kann als Hinweis auf einen Abbau der ocs3'-Sequenz des SPT-Gens zu siRNAs gewertet werden (3.4.1, Abb. 11). Auch der in diesem Abschnitt vorgeschlagene Mechanismus würde zum Verlust des Polyadenylierungssignal am 3'-Ende und evtl. der 7-Monomethyl-Guanosin-Kappe am 5'-Ende der SPT- und GFP-mRNA und damit zu den im vorigen Abschnitt beschriebenen möglichen Konsequenzen führen.

Die Aktivität der RdRP könnte zu einer Ausweitung der vom Abbau betroffenen Bereiche führen. Die in 3' - 5' Richtung erfolgende Synthese des zur *sense* mRNA komplementären Stranges könnte über die Sequenz des ocs3'-Endes hinausgehen. Dadurch würde dsRNA der codierenden Sequenz des SPT- oder GFP-Gens erzeugt, die vermutlich ebenfalls einem Abbau durch dsRNAsen unterliegen würde. Die Ausdehnung von RNA-Silencing wurde in *C. elegans* (Sijen *et al.* 2001), *D. melanogaster* (Lipardi *et al.* 2001) und in einem Fall für ein GFP-Gen auch in Pflanzen beschrieben (Voinnet *et al.* 1998). Hier wurde ein in Tabak eingebrachtes GFP-Transgen mittels VIGS inaktiviert. Das Genom des zur Infektion verwendeten Virus enthielt lediglich einen kleineren Teil des GFP-Gens. Trotzdem konnten siRNAs für die komplette Sequenz des GFP-Transkriptes nachgewiesen werden. Demgegenüber stehen Beispiele, in denen es in Pflanzen nicht zu einer Ausweitung der vom Abbau betroffenen Bereiche kam. Hierbei wurden die Gene der 1,5-Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase und der Phytoendesaturase mittels VIGS inaktiviert (Vaistij *et al.* 2002). Zwar unterlagen die Bereiche der entsprechenden mRNAs, die Sequenzhomologien zum Virusgenom aufwiesen, einem Abbau, siRNAs angrenzender mRNA-Bereiche und Hypermethylierung der entsprechenden DNA-Sequenzen konnten allerdings für beide Gene nicht nachgewiesen werden. Posttranskriptioneller Abbau der mRNA korreliert häufig mit einer Hypermethylierung der entsprechenden DNA-Sequenzen (English *et al.* 1996, Stam *et al.* 1997). In Tabak zeigten sich für ein chimäres Transgen aus viralen Sequenzen und Sequenzen des β -Glucuronidasegens nach Infektion mit dem entsprechenden Virus deutlich erhöhte Mengen verkürzter Transgentranskripte, die überwiegend am Übergang der viralen- zu den β -Glucuronidase-Sequenzen geschnitten

worden waren (Wang *et al.* 2001). Es konnten Virussequenz-spezifische siRNAs und Hypermethylierung der entsprechenden DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. GUS-Sequenz-spezifische siRNAs oder Hypermethylierung der entsprechenden DNA-Sequenzen konnten nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls keine siRNAs für die kodierenden Sequenzen des SPT- und GFP-Gens nachgewiesen werden (3.4.1, Abb. 11). Eine Methylierungsanalyse wie sie in den obigen Beispielen durchgeführt wurde, könnte nur bedingt darüber Auskunft geben, ob sich die posttranskriptionelle Inaktivierung der *ocs3'*-Sequenzen auf die kodierenden Sequenzen ausgedehnt hat, da sich in der Literatur auch Beispiele finden, in denen bei posttranskriptioneller Inaktivierung keine Hypermethylierung der entsprechenden Sequenzen nachgewiesen wurde (Jones *et al.* 1999).

4.2.4 *Antisense* vermittelte Inaktivierung der Reportergene

Die Analyse der Nachkommen aus Kreuzungen von *gs-*, *gsm-*, *gsg-* und *mgfp-* mit *as-* und *s/as-* Linien zeigte, dass in Pflanzen, die gleichzeitig eine *sense* und *antisense* Kopie des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimieren, eine Inaktivierung beider Sequenzen erfolgt. Der Nachweis von siRNAs der GUS-Sequenzen belegte eine posttranskriptionelle Inaktivierung dieser Sequenzen (3.4.3, Abb. 17). DsRNA ist ein wichtiges Zwischenprodukt im Mechanismus des RNA-Silencings (Dougherty und Parks 1995). Die gleichzeitige Expression von *sense* und *antisense* GUS-Kopien unter der Kontrolle des starken CaMV 35S-Promotors führt durch Paarung der komplementären Stränge höchstwahrscheinlich ebenfalls zu großen Mengen dsRNA. Diese könnte, wie mehrfach vorgeschlagen (Waterhouse *et al.* 1998, Di Serio *et al.* 2001), RNAi oder einen ähnlichen Mechanismus auslösen. Zusätzlich wurde vorgeschlagen, dass stark exprimierte *antisense* Kopien allein dem RNA-Silencing unterliegen und dadurch die Bildung von doppelsträngiger RNA induzieren kann (Di Serio *et al.* 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten keine Hinweise dafür gefunden werden (3.4.3, Abb. 17).

In Linien die von Silencing der GUS-Sequenzen betroffen waren, zeigten gleichzeitig anwesende SPT- und/ oder GFP-Gene deutlich verringerte steady state mRNA-Mengen (3.4.3, Abb. 16). Wie in den in 4.2.3 besprochenen Beispielen ist auch dies vermutlich eine Folge der Inaktivierung der GUS-Sequenzen. Es kann angenommen werden, dass die Übertragung auch in diesen Fällen über identische transkribierte Sequenzen erfolgt. Das

Auftreten verkürzter SPT-Transkripte, die für posttranskriptionell inaktivierte SPT-Gene typisch sind (Schubert 2002), legt nahe, dass es sich um einen Mechanismus der Inaktivierung handelt, der denen unter 4.2.3 besprochenen ähnelt.

In *antisense* GUS-Reportergekassetten liegt nicht nur die codierende Sequenz des GUS-Gens in *antisense* Orientierung vor, sondern auch die Sequenz des Ω -„leader“. Das ocs3'-Ende dieser Linien liegt in *sense* Orientierung vor. Nachkommen einer Kreuzung von mgfp- mit as-Linien zeigen keine Inaktivierung des GFP-Gens (3.4.3, Abb. 14). Vorliegen von Ω -„leader“ Sequenzen in *sense* und *antisense* Orientierung ist offenbar nicht ausreichend, um Inaktivierung auszulösen. Eventuell ist das darauf zurückzuführen, dass die Paarung der vergleichsweise kurzen Ω -„leader“ Sequenzen durch die folgenden, vergleichsweise langen und nicht komplementären GUS *antisense* und GFP *sense* Sequenzen verhindert wird.

Die Übertragung der Inaktivierung über die Sequenz des ocs3'-Ende setzt eine Ausdehnung des posttranskriptionellen Abbaus auf diese Bereiche voraus. In 4.2.3 wurde ein möglicher Mechanismus zur Ausweitung der dem Abbau unterliegenden mRNA-Bereiche in 3' - 5' Richtung besprochen. Dieses Modell basierte auf der Synthese des zur *sense* mRNA komplementären *antisense* Stranges durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP). Eine solche Synthese würde in 3' - 5' Richtung der *sense* mRNA erfolgen. Da siRNAs des bereits dem Abbau unterliegenden Bereiches in diesem Modell als „Primer“ für die RdRP dienen, könnte eine Ausweitung ebenfalls nur in 3' - 5' Richtung erfolgen. Eine Ausweitung der dem Abbau unterliegenden Bereiche der GUS-Sequenzen auf das ocs3'-Ende müsste in 5' - 3' also in umgekehrter Richtung der *sense* Transkripte erfolgen. Nach der obigen Modellvorstellung würde dies eine Funktion der GUS-Gen-spezifischen siRNAs als „Primer“ für die RdRP ausschließen. Da in Pflanzen eine Ausdehnung der von RNA-Silencing betroffenen Bereiche eines GFP-Gens in 5' - 3' Richtung nachgewiesen werden konnte (Vaistij *et al.* 2002), wurde vorgeschlagen, dass strukturelle Veränderungen der betroffenen mRNA die RdRP in die Lage versetzten unter Verzicht der siRNAs als „Primer“ eine vom 3' Ende der mRNA ausgehende Synthese des komplementären RNA Stranges durchzuführen. Für eine RdRP aus Tomate konnte „Primer“-unabhängige RNA-Synthese nachgewiesen werden (Schiebel *et al.* 1993a und b). Die Ausweitung der dem Abbau unterliegenden Bereiche auf die Sequenz des ocs3'-Endes ist die naheliegendste Erklärung für die Übertragung der Inaktivierung auf die SPT- und GFP-Gene. Bei dem fehlenden Nachweis von siRNAs für die ocs3'-Sequenz in einer s/as-Linie kann es sich dementsprechend um ein Nachweisproblem handeln.

Interessanterweise führte in den Nachkommen von Kreuzungen von as- mit pg-Linien die gleichzeitige Expression einer GUS *sense* Kopie unter dem vergleichsweise schwachen pnos-Promotor und einer *antisense* Kopie unter dem vergleichsweise starken CaMV 35S-Promotor nicht zum Silencing der GUS *antisense* Kopie (3.4.3, Abb. 17). Dies kann bedeuten, dass in diesen Kreuzungsnachkommen eine Paarung der komplementären Stränge unterbleibt, bzw. dass eine bestimmte Menge doppelsträngiger RNA vorhanden sein muss, um Silencing zu induzieren. In anderen Experimenten zeigten sich ebenfalls Unterschiede in der Wirksamkeit von *antisense* Konstrukten (zusammengefasst in Mol *et al.* 1990). Zum einen zeigte ein und dasselbe *antisense* Konstrukt in unabhängigen Transformanten unterschiedliche Effektivität in der Inhibierung des entsprechenden *sense* Gens (Jorgensen *et al.* 1996). Zum anderen zeigten unterschiedliche *antisense* Fragmente ein und desselben Gens unterschiedliche Wirksamkeit in der Inhibierung des entsprechenden *sense* Gens (De Lange *et al.* 1993). Einzelne *antisense* Fragmente waren überhaupt nicht in der Lage die entsprechenden *sense* Gene zu inaktivieren (van der Krol 1990b). Waterhouse *et al.* (1998) konnte zeigen, dass Transkripte, die gleichzeitig *sense* und *antisense* Sequenzen enthielten und zur intramolekularen Paarung fähig waren, effektiver Silencing auslösten als getrennt transkribierte *sense* und *antisense* Sequenzen. Für *C. elegans* und *D. melanogaster* Zellen wurde gezeigt, dass bereits wenige Moleküle dsRNA ausreichen, um RNAi zu induzieren (Fire *et al.* 1998, Kennerdell und Carthew 1998). Als Ursachen für die unterschiedliche Effektivität von *antisense* Konstrukten wurden unterschiedliche Stabilitäten der *antisense* Sequenzen oder mögliche Sekundärstrukturen vermutet. Beide Faktoren hätten einen Einfluss auf die effektive Paarung der *sense* und *antisense* Transkripte und damit letztendlich auf die Menge an vorliegender dsRNA.

Stabilität und Sekundärstrukturen der *antisense* Sequenzen könnten auch für das Unterbleiben von Silencing bei gleichzeitiger Expression einer GUS *sense* Kopie unter dem vergleichsweise schwachen pnos-Promotor und einer *antisense* Kopie unter dem vergleichsweise starken CaMV 35S-Promotor eine Rolle spielen.

4.2.5 Der Einfluss von Sequenzwiederholungen auf die Expression des GUS-Gens

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *gsg*-Linien mit in Tandem vorliegenden Sequenzwiederholungen sowie die beiden Linien *gsR* IR 102 und *g1xF* IR 57 mit invertiert vorliegenden Sequenzwiederholungen (IR) untersucht (3.4.4). Homozygote Vertreter, die vier Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors trugen, zeigten RNA-Silencing, hemizygoten Vertreter mit zwei Kopien zeigten stabile Expression des GUS-Gens. Diese entsprach derjenigen in Linien, die zwei Kopien des GUS-Gens an getrennten Loci trugen (3.4.4, Abb. 18). Sowohl in *gsg*-Linien als auch in den beiden IR-Linien etablierte sich das Silencing des GUS-Gens in jeder Generation erneut. Für *gsg*-Linien wurde der Nachweis von siRNAs für die kodierende Sequenz des GUS-Gens erbracht (3.4.1, Abb. 11). Beides lässt darauf schließen, dass es sich bei der Inaktivierung des GUS-Gens in den *gsg*-Linien und in den Linien, die einen IR tragen, um einen posttranskriptionellen Mechanismus handelt.

Sequenzwiederholungen in Tandem-Organisation (zusammengefasst in Selker 1999) und besonders solche in invertierter Anordnung (IRs) werden intensiv als Auslöser von Silencing diskutiert (zusammengefasst in Muskens *et al.* 2000). IRs können sowohl transkriptionelles (Vaucheret *et al.* 1996, Jakowitsch *et al.* 1999) als auch posttranskriptionelles Silencing induzieren (Hobbs *et al.* 1990 und 1993, Stam *et al.* 1997 und 2000). Für die inaktivierende Wirkung von IRs sowohl in *cis* auf die in ihnen vorliegenden Gene als auch in *trans* auf weitere homologe Gene wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, wie z. B. das Auslösen von Silencing durch die Produktion aberranter Transkripte aufgrund von im IR vorliegender Methylierung (English *et al.* 1996 und 1997) oder aufgrund der Erzeugung doppelsträngiger RNA durch Transkription des IR (Waterhouse *et al.* 1998). Durch DNA/DNA Paarung könnte das Silencing *in trans* auf homologe Sequenzen übertragen werden (zusammengefasst in Selker 1999).

Für in Tandem vorliegende Sequenzwiederholungen konnte ebenfalls transkriptionelles (Assaad *et al.* 1993 und Ye und Signer 1996) und auch posttranskriptionelles Silencing nachgewiesen werden (Ma und Mitra 2002). Für die inaktivierende Wirkung von in Tandem organisierten Sequenzwiederholungen wurden durch Paarung homologer DNA-Sequenzen ausgelöste Veränderungen der Chromatinstruktur vorgeschlagen (zusammengefasst in Vaucheret *et al.* 1998). Für *D. melanogaster* wurde vorgeschlagen, dass repetitive Sequenzen die Bildung von Heterochromatin induzieren (Dorer und

Henikoff 1994). Außerdem könnte die anhand derartiger Strukturen transkribierte RNA ein bevorzugtes Substrat des RNA-Silencing Mechanismus sein (Ma und Mitra 2002).

Für die in der vorliegenden Arbeit besprochenen IRs kann eine Erzeugung vor dsRNA durch Transkription des IR weitgehend ausgeschlossen werden. Innerhalb des IRs der Linie gsR IR 102 weisen die Transkriptionsrichtungen der SPT- und GUS-Gene nach außen auf die LB, innerhalb des IR der Linie g1xF IR 57 weisen sie zwar auf das Zentrum des IRs, aber auf die GUS-Sequenz folgen sowohl ein ocs3'-Ende als auch ein nos3'-Ende, so dass eine Termination der Transkription wahrscheinlich ist.

Die für einen IR homozygote Linie mgfpR 127, zeigte stabile GFP-Aktivität (3.6.2, Abb. 28). Die für den IR hemizygoten Linien gsR IR 102 und g1xF IR 57 weisen stabile GUS-Aktivität auf (3.4.4, Abb. 18). Und auch pg3R-Linien, die drei Kopien des GUS-Gens in Tandem-Organisation in ihrer T-DNA tragen zeigen ebenfalls kein Silencing (3.3.1). Dies macht deutlich, dass die Struktur eines IRs, oder von in Tandem organisierten Sequenzwiederholungen nicht per se zu Silencing führt, wie auch Ergebnisse vorangehender Untersuchungen nahe legen (Jones *et al.* 1987, Schubert 2002, Forsbach 2001).

Aus diesen Ergebnissen und der bereits mehrfach angesprochenen Tatsache, dass drei oder mehr gleichzeitig in einer Pflanze unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimierte GUS-Gene dem RNA-Silencing unterliegen (Schubert 2002), kann geschlossen werden, dass das Silencing der GUS-Gene in den gsg-Linien und den Linien gsR IR 102 und g1xF IR 57 durch die erhöhte Zahl exprimierter GUS-Gene ausgelöst wird. Letzteres führt vermutlich zum Überschreiten eines transkriptionellen Schwellenwertes und löst dadurch das Silencing aus. Die vorliegende Arbeit liefert damit eine neue, zusätzliche Erklärungsmöglichkeit für das bei invertiert oder in Tandem vorliegenden Sequenzwiederholungen beobachtete Silencing.

In der Literatur finden sich Beispiele, deren Ergebnisse diese zusätzliche Erklärungsmöglichkeit unterstützen. So konnten de Buck und Depicker (2001) für einen hemizygot vorliegenden IR ebenfalls kein Silencing nachweisen. Exprimierte virale Sequenzen, die sich innerhalb eines aus zwei T-DNAs gebildeten IRs befanden, zeigten erst Silencing, nachdem eine Infektion mit einem Virus erfolgte, der Sequenzhomologien zu diesen beiden Transgenen aufwies (Goodwin *et al.* 1996). Auch hier könnte das Silencing erst durch Überschreiten eines transkriptionellen Schwellenwertes, in Form des sich replizierenden Virus, ausgelöst worden sein. Ebenso interessant ist ein Fall, in dem eine zusätzlich zu einem aus endogenen Genen gebildeten IR vorliegende Kopie des

gleichen Gens zu einer Verstärkung des durch Silencing hervorgerufenen Phänotyps führt (Todd und Vodkin 1996). Diese drei Beispiele stützen die Vermutung, dass erhöhte Transkriptmengen ein Auslöser für das bei invertiert oder in Tandem vorliegenden Sequenzwiederholungen beobachtete Silencing sein können.

4.3 Expression des GUS-Gens in *N. tabacum*

Für *N. tabacum* gsmF-Linien zeigten quantitative GUS-Tests 3 Wochen alter Pflanzen eine zwischen unabhängigen Linien vergleichbare Expression des Transgens (3.5.1, Abb. 20). Dieses Ergebnis zeigt, dass vermutlich auch in *N. tabacum*, einer Spezies mit im Vergleich zu *A. thaliana* komplexen Genomstruktur, die chromosomale Umgebung nur einen geringen Einfluss auf die Expression von Transgenen unter der Kontrolle starker Promotoren hat.

Im Gegensatz zu den *A. thaliana* Einzelkopielineien, die eine gsmF-T-DNA tragen, zeigt sich für die entsprechenden *N. tabacum* Linien jedoch keine stabile Expression des GUS-Gens. Im Verlauf der Entwicklung der Pflanzen kommt es zu mehr oder minder ausgeprägtem Silencing (3.5.1, Abb. 22). In *A. thaliana* konnte dies für vergleichbare Einzelkopielineien nur in Ausnahmefällen beobachtet werden (3.4.5, Abb. 19). Für die *N. tabacum* gsm-Linien kann nicht ausgeschlossen werden, dass das beobachtete Silencing des GUS-Gens von einem zuvor inaktivierten SPT- oder GFP-Gen auf dieses übertragen worden war. Allerdings beobachtete Schubert (2002) in transgenen *N. tabacum* Linien, die lediglich ein GUS-Gen in einer vergleichbaren T-DNA trugen, ebenfalls Silencing des GUS-Gens.

Die Beobachtung, dass in *N. tabacum* auch für die T-DNA hemizygote gsmF-Linien Inaktivierung des GUS-Gens aufwies (3.5.1, Abb. 22), zeigt, dass bereits eine Kopie eines Transgens von Silencing betroffen sein kann. Silencing lediglich einer Kopie des GUS-Gens wurde bereits beschrieben (Elmayan und Vaucheret 1996). Inaktivierungsmechanismen, die auf DNA/DNA Wechselwirkungen beruhen, können in diesem Fall ausgeschlossen werden. Auch wenn der Nachweis von siRNAs für die in *N. tabacum* inaktivierten GUS-Gene noch aussteht, so deutet das im Verlauf der Entwicklung etablierte Silencing und die meiotische Reversibilität, wie in *A. thaliana* auf einen posttranskriptionellen Mechanismus der Inaktivierung hin.

N. tabacum gsmR-Linien zeigten im Alter von drei Wochen im Vergleich zu gsmF-Linien deutlich niedrigere GUS-Aktivität (3.5.1, Abb. 20). Da kolorimetrische GUS-

Aktivitätstests andeuteten, dass sich die GUS-Aktivität im Verlauf der Entwicklung weiter erniedrigte, ist anzunehmen, dass es sich um ein bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt einsetzendes posttranskriptionelles Silencing des GUS-Gens und nicht um eine grundsätzlich geringere Expression des GUS-Gens in *N. tabacum* gsmR-Linien handelt. Quantitative GUS-Tests zu noch früheren und dann verschiedenen Zeitpunkten könnten Aufschluss darüber geben, wann Silencing in den gsmF- und gsmR-Linien einsetzt. Für *A. thaliana* wurde gezeigt, dass gsmR-Linien im Gegensatz zu gsmF-Linien, vermutlich aufgrund höherer Expression der Reportergene, sowohl höhere GUS-Aktivität als auch GFP-Fluoreszenz aufweisen (3.2.1, Abb. 5). Nimmt man für Tabak einen vergleichbaren Effekt an und setzt voraus, dass auch in *N. tabacum* eine transkriptionelle Schwelle besteht, ab der Silencing des betreffenden Gens einsetzt, so könnte dies die vergleichsweise raschere Inaktivierung des GUS-Gens in *N. tabacum* gsmR-Linien erklären.

Ein Vergleich der Expressionsanalysen des GUS-Gens in *N. tabacum* und *A. thaliana* lässt vermuten, dass in beiden Spezies grundsätzlich gleiche Regulationsmechanismen vorliegen, diese jedoch in speziesspezifischer Ausprägung. Demnach sind Voraussagen bezüglich des exakten Verhaltens von Transgenen in verschiedenen Spezies nur schwer möglich.

4.4 RNA-Silencing als Hauptursache der Variabilität der Transgenexpression in T-DNA-transformierten *A. thaliana* Populationen

In der umfassenden Analyse der Population, die mit den Dg-T-DNA-Konstrukten transformiert worden war, zeigte sich eine Korrelation zwischen der in einer Linie vorliegenden Kopienzahl der T-DNAs und der Inaktivierung des GUS-Gens (3.6.1, Tab. 9). In alle Linien, die von Inaktivierung des GUS-Gens betroffen waren, lagen Hinweise auf eine erhöhte Zahl vorliegender T-DNA Loci vor. Allerdings zeigten sich auch für einige Linien mit stabiler GUS-Aktivität Hinweise auf eine erhöhte Kopienzahl an integrierten T-DNAs (DgF 125, 126 und DgR 100 und 104, Tab. 9). Es wäre möglich, dass in diesen Linien lediglich zusätzliche T-DNA-Fragmente vorliegen, die LB- oder RB-Sequenzen, aber kein funktionelles GUS-Gen tragen. Für die Linien DgF 109 und 118 konnten beispielsweise zusätzliche LB-Fragmente nachgewiesen werden. Die Linie DgF 126 wies eine aberrante Segregation Kanamycin-Resistenter zu -sensitiven Pflanzen von

nahezu 2:1 auf (Tab. 9). Die Integration der T-DNA könnte hier zu einer embryoletalen Mutation geführt haben, so dass für den T-DNA Locus homozygote Individuen nicht lebensfähig sind. Selbst wenn an diesem Locus zwei Kopien der T-DNA integriert sind, wie die Southern Blot-Analyse andeutet, würde diese Linie nicht mehr Kopien des GUS-Gens tragen, als eine homozygote Einzelkopielinie. Dies könnte die stabil hohe GUS-Aktivität der Linie DgF 126 erklären.

Die Linie DgF 116 zeigte in allen durchgeführten Tests niedrige GUS-Aktivität. Ein Nachweis von siRNAs konnte für diese Linie nicht erbracht werden. Hier müssen weitergehende Experimente zeigen, ob es sich um Silencing des GUS-Gens handelt.

Für alle übrigen Linien, die von Inaktivierung des GUS-Gens betroffen waren, kann aufgrund der Etablierung des Silencing im Verlauf ihrer Entwicklung und, in ausgesuchten Fällen, des Nachweises von siRNAs (3.6.1, Abb. 27) posttranskriptionelle Inaktivierung des GUS-Gens angenommen werden. Dies trifft auch für das GFP-Gen zu. In der mgfp-Population konnten anhand quantitativer GFP-Fluoreszenztests vier Linien identifiziert werden, die im Laufe ihrer Entwicklung einen Verlust der GFP-Fluoreszenz aufwiesen (3.6.2, Abb. 29). für alle vier Linien konnte der Nachweis von GFP-Gen-spezifischen siRNAs erbracht werden (3.6.2, Abb. 30).

Die Variabilität der GUS-Aktivitätswerte der Linien der DG-Populationen ist folglich in erster Linie auf RNA-Silencing der GUS-Gene zurückzuführen. Sie stellt keine stabilen Unterschiede zwischen unabhängigen Linien dar, sondern ist eine Momentaufnahme des zu unterschiedlichen Zeitpunkten einsetzenden und fortschreitenden Inaktivierungsprozesses. Die Variabilität entspricht damit derjenigen, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die gsg-Linien gezeigt wurde (3.4.1, Abb. 9).

Für andere T-DNA-transformierte Populationen, deren Mitglieder Reportergene trugen, die ebenfalls unter der Kontrolle eines starken Promotors standen, wurde ebenfalls Variabilität gefunden (Williamson *et al.* 1989, Comai *et al.* 1990, Peach und Velten 1991, Holtorf *et al.* 1995). Die dort beobachtete Variabilität wurde häufig anders, z. B. als „Positionseffekt“ gedeutet (Peach und Velten 1991, Holtorf *et al.* 1995). In den angesprochenen Untersuchungen wurden die Mitglieder der Populationen nicht, wie in der vorliegenden Arbeit umfassend genetisch und molekular charakterisiert, auch wurde die Aktivität der Reportergene oft nicht über einen langen Zeitraum dokumentiert. Dies erschwert einen Vergleich.

Dennoch finden sich Hinweise, dass auch in den erwähnten Populationen RNA-Silencing vorliegt. Von Holtorf *et al.* (1995) wurden verschiedene Populationen transgener A.

thaliana Pflanzen untersucht, die GUS-Gene unter der Kontrolle verschieden starker Promotoren trugen. Eine Population, deren 24 Mitglieder mit einem T-DNA-Konstrukt transformiert worden waren, das ein GUS-Gen unter der Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors trug, zeigte nach 12 Tagen ca. 70-fache Unterschiede in der GUS-Aktivität einzelner Individuen. Nach vier Wochen wurden ca. 500-fache Unterschiede in der GUS-Aktivität beobachtet. Eine derartige Zunahme der Variabilität ist zu erwarten, wenn bei fortschreitender Etablierung des Silencings diejenigen Linien, die Inaktivierung des GUS-Gens zeigen, immer niedrigere Werte der GUS-Aktivität erreichen. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Population der Dg-Linien zeigte im Verlauf ihrer Entwicklung eine Zunahme der Variabilität (3.6.1).

Eine ausführlichere Analyse einer allerdings eher kleinen transgenen Tabak-Population wurde von Hobbs *et al.* (1990) durchgeführt. Sie umfasste 10 transgene Tabaklinien, deren Mitglieder mit einem T-DNA-Konstrukt transformiert worden waren, das ein GUS-Gen unter der Kontrolle eines CaMV 35S-Promotors trug. Linien der T1-Generation, die lediglich eine Integration der T-DNA aufwiesen, zeigten untereinander vergleichbare, relativ hohe GUS-Aktivität. Die Variabilität zwischen verschiedenen Individuen reichte von 2- bis 4-fach. Die übrigen Linien zeigten Integration von mehreren T-DNAs. Unter diesen Linien zeigte sich oft niedrige GUS-Aktivität und 3- bis 80-fache Unterschiede derselben in verschiedenen Pflanzen. Da Linien mit lediglich einer T-DNA-Integration vergleichsweise geringe Variabilität zeigten, wurde ein „Positionseffekt“ als Ursache für die ansonsten beobachteten Unterschiede ausgeschlossen (Hobbs *et al.* 1990). Die in dieser Untersuchung gefundenen Verhältnisse entsprechen also denjenigen in der Dg-Population. Allerdings wurde für die Tabak-Linien weder die GUS-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt, noch andere Analysen zum Nachweis von posttranskriptionellem Silencing durchgeführt, so dass keine Aussagen über die Ursachen der gefundenen Unterschiede gemacht wurden.

Der in der vorliegenden Arbeit gemachte Vorschlag, dass es sich bei der beobachteten Variabilität in T-DNA-transformierten Populationen nicht um stabile Unterschiede zwischen unabhängigen Linien handelt, sondern um zu verschiedenen Zeitpunkten einsetzendes und dann fortschreitendes RNA-Silencing, hat wichtige Konsequenzen. T-DNA-transformierte Population dienen oft dazu, transgene Pflanzen zu etablieren, die Transgene verlässlich exprimieren sollen. Eine nur einmalig durchgeführte quantitative Analyse zur Ermittlung der Expression des Transgens gibt keinen Aufschluss darüber, ob dieses stabil exprimiert wird, oder ob es evtl. von Silencing betroffen ist. Für Pflanzen die

erst sehr spät Silencing zeigen, könnten selbst mehrfach durchgeführte quantitative Analysen irreführend sein. Da sich RNA-Silencing systemisch in der Pflanze ausbreitet (Palauqui *et al.* 1997, Voinnet und Baulcombe 1997), stellen Pflanzen in denen dies geschieht ein Mosaik aus Bereichen dar, in denen das Transgen noch aktiv ist und weiteren Bereichen in denen es bereits inaktiviert ist. Je nach eingesetztem Blattmaterial kann es in unterschiedlichen Analysen zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Dies belegt die nur eingeschränkte Korrelation zwischen der Northern Blot-Analyse und den kolorimetrischen GUS-Tests der von Silencing betroffenen Dg-Linien (3.6.1, Abb. 26). Möglicherweise kann selbst durch eine umfassende Analyse nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die untersuchten transgenen Linien Silencing aufweisen.

Das sogenannte Schwellenwert-Modell besagt, dass RNA-Silencing durch Überschreiten eines transkriptionellen Schwellenwertes ausgelöst wird (Dehio und Schell 1994, Vaucheret *et al.* 1998, Schubert 2002). Damit hätten alle Faktoren, die Transkription beeinflussen, auch Auswirkungen auf das Silencing und damit die Variabilität in T-DNA-transformierten Populationen. Auch dies sollte bei der Etablierung transgener Linien berücksichtigt werden. So könnten z. B. Pflanzen, die unter gewissen Umweltbedingungen stabile Expression zeigen, durch gesteigerte Expression unter anderen Umweltbedingungen den transkriptionellen Schwellenwert überschreiten und von Inaktivierung des Transgens betroffen sein. Dass Umweltbedingungen einen Einfluss auf die Inaktivierung von Transgenen haben, wurde bereits gezeigt (Meyer *et al.* 1992).

Für die Übertragbarkeit der hier vorgestellten Ergebnisse auf andere Transgen-Populationen müssen Einschränkungen gemacht werden. So zeichnen sich unterschiedliche Transformationsmethoden durch unterschiedliche Integrationsmuster der in die Pflanze eingebrachten DNA. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Agrobakterien-vermittelten T-DNA Transformation gewählt, weil für sie bekannt ist, dass sie zu einer vergleichsweise geringen Anzahl von T-DNA-Integrationen mit niedriger Komplexität führt (zusammengefasst in Tinland 1996). Bei Agrobakterien-vermittelter T-DNA Transformation können bereits die Wahl der zu transformierenden Pflanzenexplantate und die spezifischen Transformationsbedingungen die Komplexität der resultierenden Transgen-Loci beeinflussen (Grevelding *et al.* 1993). Methoden des „nackten DNA-Transfers“ wie „Polyethylenglycol-vermittelte Protoplasten-Transformation“ oder „particle bombardment“ führen häufig zu einer großen Zahl an einem Locus integrierter Genkopien (Christou 1992, Pawlowski und Somers 1998). Populationen, die mit diesen Techniken transformiert wurden, könnten z. B. mit höherer Frequenz transkriptionelles Silencing

aufweisen. Die transgene DNA einiger Loci, die transkriptionelles Silencing zeigen, wurde mittels „nacktem DNA-Transfer“ in die Untersuchungspflanzen eingebracht (z. B. Mittelsten-Scheid *et al.* 1991). Evtl. führt beim „nackten Gentransfer“ auch der Transformationsvorgang als solcher, bzw. die dabei vorliegenden großen Mengen DNA, zu Veränderungen der transformierten DNA, die meiotisch stabil vererbt werden und die Expression der Transgene beeinflussen. So wurde Variabilität der GUS-Aktivität zwischen unabhängigen transgenen Linien beobachtet, die lediglich je eine Kopie des GUS-Gens an einem bestimmten Locus im Tabakgenom trugen (Day *et al.* 2000).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden wichtige Fragestellungen der Transgenexpression und Inaktivierung in Pflanzen bearbeitet.

In 17 unabhängigen *A. thaliana* Linien, die je zwei Kopien eines chimären β -Glucuronidasegens (GUS), eines Streptomycinphosphotransferasegens (SPT) und eines Gens für das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors trugen, wurde eine stabile, koordinierte und zwischen unabhängigen Linien vergleichbare Expression ermittelt. Zwischen gleichaltrigen Pflanzen unabhängiger Linien wurden lediglich 2 – 3-fache Unterschiede in der Expression des GUS- oder GFP-Gens festgestellt. Stabil exprimierte Kopien des GUS-, SPT- und GFP-Gens beeinflussten sich nicht gegenseitig in ihrer Expression.

Die Inaktivierung des GUS-Gens, hervorgerufen durch die gleichzeitige Expression von drei oder mehr Kopien des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors oder durch die gleichzeitige Expression einer *sense* und *antisense* Kopie des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, konnte auf weitere hochexprimierte Reportergene mit Sequenzhomologien in transkribierten Bereichen übertragen werden.

Für GUS-Gene, die unter der Kontrolle des vergleichsweise schwachen Promotors des Nopalinsynthasegens (pnos) standen, konnte auch bei bis zu sechs exprimierten Kopien des GUS-Gens kein Silencing nachgewiesen werden. Es wurden bis zu 23-fache, stabile Unterschiede in der Expression des GUS-Gens in 18 unabhängigen *A. thaliana* Linien gefunden. Dies legt nahe, dass der Einfluss der chromosomalen Umgebung auf Transgene, die unter der Kontrolle schwacher Promotoren stehen, ausgeprägter ist als für Transgene unter der Kontrolle starker Promotoren.

Die Analyse einer transgenen *A. thaliana* Population zeigte, dass die dort zwischen unabhängigen Linien gefundenen, bis zu 1500-fachen Unterschiede in der Expression des GUS-Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors zum Grossteil auf fortschreitendem posttranskriptionellem Silencing des GUS-Gens beruhten. Silencing korrelierte mit erhöhten Kopienzahlen des GUS-Gens.

In *N. tabacum* konnte in 3 Wochen alten Pflanzen von 17 unabhängigen Linien, die das GUS-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors trugen, vergleichbare Expression festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Entwicklung der Pflanzen kam es zur Inaktivierung des GUS-Gens. Im Gegensatz zu *A. thaliana* war in *N. tabacum* bereits eine Kopie des GUS-Gens von Silencing betroffen.

6 Abstract

This study focused on the regulation of transgene expression and silencing in *A. thaliana* und *N. tabacum*.

Expression analysis of 17 independent transgenic *A. thaliana* lines, each harbouring two copies of a chimaeric β -glucuronidase gene (*gus*), a streptomycin phosphotransferase gene (*spt*) and a gene for the green fluorescent protein (*gfp*), all under the control of the CaMV 35S promoter revealed a stable, coordinated and comparable expression. Plants of the same age revealed 2 – 3-fold differences in expression level between independent lines. Stably expressed *gus*-, *spt*- and *gfp* genes did not influence each other's expression.

Inactivation of the *gus* gene, caused either by simultaneous expression of three or more copies of the *gus* gene under the control of the CaMV 35S promoter or by simultaneous expression of a *sense* and *antisense* copy of the *gus* gene, both under the control of the CaMV 35S promoter, was transmitted to other reporter genes sharing sequence homologies in transcribed regions.

A *gus* gene was placed under the control of the comparatively weak promoter of the nopaline synthase gene (*pnos*). Even lines harbouring six copies of this construct showed no evidence for silencing of the *gus* gene. The analysis of 18 independent *A. thaliana* lines revealed up to 23-fold differences in *gus* gene expression. This suggests, that the influence caused by the site of integration within the genome of *A. thaliana* is more pronounced for reporter genes under the control of a weak promoter than for reporter genes under the control of a strong promoter.

A. thaliana plants were transformed with a T-DNA construct harbouring a *gus* gene under the control of the CaMV 35S promoter. Analysis of the resulting population of independent transgenic *A. thaliana* lines revealed that the large differences in *gus* gene expression of up to 1500-fold seen among these lines were mainly due to the increasing post-transcriptional gene silencing of the *gus* gene throughout plant development.

Three weeks old *N. tabacum* plants of 17 independent lines harbouring a *gus* gene under the control of the CaMV 35S promoter showed comparable transgene expression. Older *N. tabacum* plants displayed silencing of the *gus* gene. In contrast to *A. thaliana* even one copy of the *gus* gene under the control of the CaMV 35S promoter was silenced in *N. tabacum*.

7 Literaturverzeichnis

- Abler M.L. und Green P.J. 1996.** Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol Biol* 32: 63-78
- Al-Kaff N.S., Covey S.N., Kreike M.M., Page A.M., Pinder R. und Dale P.J. 1998.** Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279: 2113-5
- An Y., McDowell J., Huang S., McKinney E., Chambliss S. und Meagher R. 1996.** Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J* 10: 107-21
- Anandalakshmi R., Marathe R., Ge X., Herr J.M. Jr., Mau C., Mallory A., Pruss G., Bowman L. und Vance VB. 2000.** A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290: 142-4
- Arugmuganathan K. und Earle E.D. 1991.** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-18
- Assaad F.F., Tucker K.L. und Signer E.R. 1993.** Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 22: 1067-85
- Bancroft I., Bhatt A.M., Sjodin C., Scofield S., Jones J.D. und Dean C. 1992.** Development of an efficient two-element transposon tagging system in Arabidopsis thaliana. *Mol Gen Genet* 233: 449-61
- Baulcombe D.C. 1996.** RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 32: 79-88
- Baulcombe D.C. und English J.J. 1996.** Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional silencing in transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* 7: 173-80
- Bechtold N., Ellis J. und Pelletier G. 1993.** In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *A. thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-9
- Bender J. und Fink G.R. 1995.** Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of Arabidopsis. *Cell* 83: 725-34
- Benfey P.N., Ren L. und Chua N.H. 1989.** The cCaMV enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J* 8:2195-2202
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. und Hannon G.J. 2001.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-6
- Borisjuk N., Borisjuk L., Komarnytsky S., Timeva S., Hemleben V., Gleba Y. und Raskin I. 2000.** Tobacco ribosomal DNA spacer element stimulates amplification and expression of heterologous genes. *Nat Biotech* 18: 1303-306
- Breyne P., Gheysen G., Jacobs A., Van Montagu M. und Depicker A. 1992.** Effect of T-DNA configuration on transgene expression. *Mol Gen Genet* 235: 389-96

- Brigneti G., Voinnet O., Li W.X., Ji L.H., Ding S.W. und Baulcombe D.C. 1998.** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17: 6739-46
- Caponigro G. und Parker R. 1996.** Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60: 233-49
- Chen L., Marmey P., Taylor N.J., Brizard J.P. und Espinoza C. 1998.** Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat Biotech* 16: 1060-64
- Christou P. 1992.** Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant J* 2: 275-81
- Chuang C. und Meyerowitz E. M. 2000.** Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4985-90
- Church G.M. und Gilbert W. 1984.** Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 1991-5
- Clough S.J. und Bent A.F. 1998.** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743
- Coen E.S. und Carpenter R. 1988.** A semi-dominant allele, *niv-525*, acts in trans to inhibit expression of its wild-type homologue in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* 7: 877-83
- Comai L., Moran P. und Maslyar D. 1990.** Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S- and MAS elements. *Plant Mol Biol* 15: 373-81
- Dalmay T., Hamilton A., Rudd S., Rudd S., Angell S. und Baulcombe D.C. 2000.** An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-53
- Dasgupta S., Collins G.B. und Hunt A.G. 1998.** Co-ordinated expression of multiple enzymes in different subcellular compartments in plants. *Plant J* 16: 107-16
- Day C.D., Lee E., Kobayashi J., Holappa L.D., Albert H. und Ow D.W. 2000.** Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* 14: 2869-80
- Dean C., Favreau M., Tamaki S., Bond-Nutter D., Dunsmuir P. und Bedbrook J. 1988a.** Expression of tandem gene fusions in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res* 16: 7601-17
- Dean C., Jones J., Favreau M., Dunsmuir P. und Bedbrook J. 1988b.** Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res* 16: 9267-83
- Dean C. und Schmidt R. 1995.** Plant genomes: a current molecular description. *Ann Rev Plant Phys* 46: 395-418
- De Buck S. und Depicker A. 2001.** Disruption of their palindromic arrangement leads to selective loss of DNA methylation in inversely repeated gus transgenes in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics* 265: 1060-8

- De Carvalho F., Gheysen G., Kushnir S., van Montagu M., Inze D., und Castresana C. 1992.** Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J* 11: 2595-602
- Dehio C. und Schell J. 1994.** Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5538-42
- Delauney A.J., Tabaeizadeh Z und Verma D.P.S. 1988.** A stable bifunctional antisense transcript inhibiting gene expression in transgenic plants *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4300-304
- Dellaporta S.L., Wood J. und Hicks J.B. 1983.** A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21
- De Neve M., van Houdt H., Bruyns A.M., van Montagu M. und Depicker A. 1998.** Screening for transgenic lines with stable and suitable accumulation levels of a heterologous protein. In: C. Cunningham and A.J.R. Porter (Eds.) *Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically useful Compounds (Methods in Biotechnology, Vol. 3)* Humana Press, Totowa, NJ, pp. 203-227
- Depicker A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P. und Goodman H.M. 1982.** Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Genet* 1: 561-73
- De Greve H., Dhaese P., Seurinck J., Lemmers M., Van Montagu M. und Schell J. 1982.** Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmid-encoded octopine synthase gene. *J Mol Appl Genet* 1: 499-511
- De Lange P., de Boer G.J., Mol J.N.M. und Kooter J.M. 1993** Conditional inhibition of β -glucuronidase expression by antisense gene fragments in petunia protoplasts. *Plant Mol Biol* 23: 45-55
- De Wilde C., De Rycke R., Beeckman T., De Neve M., Van Montagu M., Engler G. und Depicker A. 1998.** Accumulation pattern of IgG antibodies and Fab fragments in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Cell Physiol* 39: 639-46
- De Wilde C., Van Houdt H., De Buck S., Angenon G., De Jaeger G. und Depicker A. 2000.** Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant Mol Biol* 43: 347-59
- Di Serio F., Schob H., Iglesias A., Tarina C., Bouldoires E. und Meins F. Jr. 2001.** Sense- and antisense-mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressors and is associated with accumulation of small RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6506-10
- Dorlhac de Borne F., Vincentz M., Chupeau Y. und Vaucheret H. 1994.** Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* 243: 613-21
- Dorer D.R. und Henikoff S. 1994.** Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77: 993-1002.

- Dougherty W.G. und Parks T.D. 1995.** Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Curr Opin Cell Biol* 7: 399-405
- Ecker J.R. und Davis R.W. 1986** Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5372-76
- Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A., Lendeckel W. und Tuschl T. 2001.** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20: 6877-88
- Elmayan T. und Tepfer M. 1994.** Synthesis of a bifunctional metallothionein/beta-glucuronidase fusion protein in transgenic tobacco plants as a means of reducing leaf cadmium levels. *Plant J* 6: 433-40
- Elmayan T. und Vaucheret H. 1996.** Expression of single copies of a strongly expressed CaMV 35S-transgene can be silenced posttranscriptionally. *Plant J.* 9: 787-97
- English J.J., Mueller E. und Baulcombe D.C. 1996.** Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8: 179-88
- English J.J., Davenport G.F., Elmayan T., Vaucheret H. und Baulcombe D.C. 1997.** Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans inactivation. *Plant J* 12: 597-603
- Fagard M., Boutet S., Morel J.B., Bellini C. und Vaucheret H. 2000.** AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11650-4
- Feinberg A.P. und Vogelstein B. 1983.** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. und Mello C.C. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11
- Flavell R.B. 1994.** Inactivation of gene expression in plants antisense a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3490-6
- Forsbach A. 2001.** T-DNA-Integration und Regulation von Transgenexpression in *A. thaliana*. Dissertation an der Universität zu Köln
- Furner I.J., Sheikh M.A. und Collett C.E. 1998.** Gene silencing and homology-dependent gene silencing in Arabidopsis: genetic modifiers and DNA methylation. *Genetics* 149: 651-62
- Gallie D.R., Lucas W.L. und Walbotv. 1989.** Visualizing mrRNA expression in plant protoplasts: Factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* 1: 301-11
- Gallie D.R. 1998.** A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216: 1-11
- Gidoni D., Bond-Nutter D., Brosio P., Jones J. und Bedbrook J. 1988** Coordinated expression between two photosynthetic petunia genes in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 211: 507-14

- Gils M. 2000.** Studien zur Expression von Transgenen: Gen-Silencing in *A. thaliana*. Dissertation an der Universität zu Köln
- Goodwin J., Chapman K., Swaney S., Parks S., Wernsman E.A. und Dougherty W.G. 1996.** Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* 8: 95-105
- Grevelding C., Fantes V., Kemper E., Schell J. und Masterson R. 1993.** Single-copy T-DNA insertions in Arabidopsis are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf discs. *Plant Mol Biol* 23: 847-60
- Guevara-Garcia A., Lopez-Bucio J. und Herrera-Estrella L. 1999.** The mannopine synthase promoter contains vectorial cis-regulatory elements that act as enhancers and silencers. *Mol Gen Genet* 262: 608-17
- Halpin C., Cooke S.E., Barakate A., El Amrani A. und Ryan M.D. 1999.** Self-processing 2A-polyproteins--a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. *Plant J* 17: 453-9
- Hamilton A.J. und Baulcombe D.C. 1999.** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-2
- Hammond S.M., Bernstein E., Beach D. und Hannon G.j. 2000.** An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-96
- Han Y. und Grierson D. 2002.** Relationship between small antisense RNAs and aberrant RNAs associated with sense transgene mediated gene silencing in tomato. *Plant J* 29: 509-19
- Hanahan D. 1983** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
- Haselhoff J., Siemering K.R., Prasher D.C. und Hodge S. 1997.** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl acad Sci U S A* 94: 2122-27
- Hobbs S.L., Kpodar P. und DeLong C.M. 1990.** The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol* 15: 851-64
- Hobbs S.L., Warkentin T.D. und DeLong C.M. 1993.** Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol Biol* 21: 17-26
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J. und Schilperoort R.A. 1983.** A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *A. tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-80
- Holtorf S., Apel K. und Bohlmann H. 1995.** Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 29: 637-46
- Horsch R.B., Fry E.F., Hoffmann N.L., Eichholtz D., Rogers S.G. und Fraley R.T. 1985.** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-31

- Hughes E.H. und Shanks J.V. 2002.** Metabolic engineering of plants for alkaloid production. *Metab Eng* 4: 41-8
- Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J. und Maas C. 1995.** Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* 8: 97-109
- Jacobsen S.E., Running M.P. und Meyerowitz E.M. 1999.** Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126: 5231-43
- Jakowitsch J., Papp I., Moscone E.A., van der Winden J., Matzke M. und Matzke A.J. 1999.** Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. *Plant J* 17:131-40
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. 1987** GUS fusions: beta-glucuronidase antisense a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*; 6: 3901-7
- Jones A.L., Thomas C.L.und Maule A.J. 1998.** De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA-Virus. *EMBO J* 17: 6385-93
- Jones L., Hamilton A.J., Voinnet O., Thomas C.L., Maule A.J. und Baulcombe D.C. 1999.** RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11: 2291-301
- Jones L., Ratcliff F. und Baulcombe D.C. 2001.** RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 11: 747-57
- Jones J.D.G. Gilbert D.E., Grady K.L. und Jorgensen R.A. 1987.** T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. *Mol Gen Genet* 207: 478-85
- Jones J.D.G., Carland F.M., Maliga P., Dooner H.K. 1989.** Visual detection of transposition of the maize element Activator (Ac) in tobacco seedlings. *Science* 244: 204-7
- Jones J.D., Shlumukov L., Carland F., English J., Scofield S.R., Bishop G.J. und Harrison K. 1992.** Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Res* 1: 285-97
- Jorgensen R.A., Cluster P.D., English J., Que Q. und Napoli C.A. 1996.** Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 31: 957-73
- Kennerdell J.R. und Carthew R.W. 1998.** Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* 95: 1017-26
- Kim M., Canio W., Kessler S. und Sinha N. 2001.** Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 293: 287-9
- Klimyuk V.I., Nussaume L., Harrison K. und Jones J.D. 1995.** Novel GUS expression patterns following transposition of an enhancer trap Ds element in Arabidopsis. *Mol Gen Genet.* 249: 357-65.

- Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Korber H., Redei G.P. und Schell J. 1989.** High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8467-71
- Leech M.J., May K., Hallard D., Verpoorte R., De Luca V. und Christou P. 1998.** Expression of two consecutive genes of a secondary metabolic pathway in transgenic tobacco: molecular diversity influences levels of expression and product accumulation. *Plant Mol Biol* 38: 765-74
- Lechtenberg B. 1999.** Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in *A. thaliana*. Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Li J. und Nam KH. 2002.** Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295 1299-301
- Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M. und Dougherty W.G. 1993.** Induction of highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-59
- Lipardi C., Wei Q. und Paterson B.M. 2001.** RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107: 297-307
- Lough T., Tourneur C., Masson J. und Robaglia C. 1997** Expression of genes in transgenic plants from bicistronic transcriptional units. *Plant Sci* 129: 91-99
- Luff B., Pawlowski L. und Bender J. 1999.** An inverted repeat triggers cytosine methylation of identical sequences in Arabidopsis. *Mol Cell* 3: 505-11
- Ma C. und Mitra A. 2002** Intrinsic direct repeats generate consistent post-transcriptional gene silencing in tobacco. *Plant J* 31: 37-49
- Maliga P., Svab Z., Harper E.C. und Jones J.D. 1988** Improved expression of streptomycin resistance in plants due to a deletion in the streptomycin phosphotransferase coding sequence. *Mol Gen Genet* 214: 456-59
- Mallory A.C., Ely L., Smith T.H., Marathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L. und Vance V.B. 2001.** HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13: 571-83
- Malpartida F., Zalacain M., Jimenez A. und Davies J. 1983.** Molecular cloning and expression in streptomyces lividans of a hygromycin B phosphotransferase gene from Streptomyces hygroscopicus. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 6-12
- Maqbool S.B. und Christou P. 1999.** Multiple traits of agronomic importance in transgenic india rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol Breed* 5: 471-80
- Matsumura M., Katakura Y., Imanaka T. und Aiba S. 1984.** Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by a plasmid pUB110. *J. Bacteriol* 160: 413-20

- Matzke M.A., Primig M., Trnovsky J. und Matzke A.J.M. 1989.** Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J* 8: 643-49
- Matzke M.A., Moscone E.A., Park Y.D., Papp I., Oberkofler H., Neuhuber F. und Matzke A.J. 1994.** Inheritance and expression of a transgene insert in an aneuploid tobacco line. *Mol Gen Genet* 245: 471-85
- McClintock B. 1951.** Chromosome organisation and genetic expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 16: 13-47
- Mette M.F., van der Winden J., Matzke M.A. und Matzke A.J. 1999.** Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO J* 18: 241-8
- Mette M.F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M.A. und Matzke A.J. 2000.** Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J* 19: 5194-201
- Metzlaff M., O'Dell M., Cluster P.D. und Flavell R.B. 1997.** RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* 88: 845-54
- Meyer P, Linn F, Heidmann I, Meyer H, Niedenhof I, Saedler H. 1992.** Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol Gen Genet* 231: 345-52
- Mishra K.S., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L. und Scharf K.D. 2002** In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev* 16: 1555-67
- Mittelsten Scheid O., Paszkowsky J. und Potrykus I. 1991.** Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 228: 104-12
- Mlotshwa S., Voinnet O., Mette M.F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S.W., Pruss G. und Vance V.B. 2002.** RNA-Silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* 14 Suppl.: S289-301
- Mlynarova L., Loonen A., Mietkiewska E., Jansen R.C. und Nap J.P. 2002.** Assembly of two transgenes in an artificial chromatin domain gives highly coordinated expression in tobacco. *Genetics* 160: 727-40
- Mol J.N., van der Krol A.R., van Tunen A.J., van Blokland R., de Lange P. und Stuitje A.R. 1990.** Regulation of plant gene expression by antisense RNA. *FEBS Lett* 268: 427-30
- Mourrain P., Beclin C., Elmayer T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Jouette D., Lacombe A.M., Nikic S., Picault N., Remoue K., Sanial M., Vo T.A. und Vaucheret H. 2000.** *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-42
- Morel J.B, Godon C., Mourrain P., Beclin C., Boutet S., Feuerbach F., Proux F. und Vaucheret H. 2002.** Fertile Hypomorphic ARGONAUTE (ago1) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance. *Plant Cell* 14: 629-39

- Muskens M.W., Vissers A.P., Mol J.N. und Kooter J.M. 2000.** Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* 43: 243-60
- Napoli C., Lemieux C. und Jorgensen R. 1990.** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene in petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-89
- Nawrath C., Poirier Y. und Somerville C. 1994.** Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12760-4
- Ochman H., Gerber A.S. und Hartl D.L. 1988.** Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-23
- Odell J.T., Nagy F. und Chua N.-H. 1984.** Identification of DNA sequences required for the activity of the cauliflower mosaic virus CaMV 35S-promoter. *Nature* 313: 810-12
- Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M. und Vaucheret H. 1997.** Systemic acquired silencing: transgene specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16: 4738-45; *Erratum EMBO J* 1998 17: 2137
- Park Y.D., Papp I., Moscone E.A., Iglesias V.A., Vaucheret H., Matzke A.J. und Matzke M.A. 1996.** Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J* 9: 183-94
- Pawlowski W.P. und Somers D.A. 1998.** Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12106-10
- Peach C. und Velten J. 1991.** Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol* 17: 49-60
- Pröls F. und Meyer P. 1992.** The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J* 2: 465-75
- Que Q., Wang H.-Y., English J. und Jorgensen R. 1997.** The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in transgene coding sequence. *Plant Cell* 9: 1357-68
- Ratcliff F., Harrison B.D. und Baulcombe D.C. 1997.** A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558-60
- Ruiz M.T., Voinnet O. und Baulcombe D.C. 1998.** Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937-46
- Russo V.E.A., Martienssen R.A. und Riggs A.D. 1996.** Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1-5
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanders PR, Winter JA, Barnason AR, Rogers SG, Fraley RT. 1987.** Comparison of cauliflower mosaic virus CaMV 35S- and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res* 15: 1543-58

- Sang Y., Zheng S., Li W., Huang B. und Wang X. 2001.** Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dalpha. *Plant J* 28: 135-44
- Schiebel W., Pelissier T., Riedel L., Thalmeir S., Schiebel R., Kempe D., Lottspeich F., Sanger H.L. und Wassenegger M. 1998.** Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* 10: 2087-101
- Schiebel W., Haas B., Marinkovic S., Klanner A. und Sanger H.L. 1993a.** RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J Biol Chem* 268: 11858-67
- Schiebel W., Haas B., Marinkovic S., Klanner A. und Sanger H.L. 1993b.** RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. Purification and physical properties. *J Biol Chem* 268: 11851-7
- Schubert D. 1999.** Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in *A. thaliana*. Diplomarbeit an der Universität zu Köln
- Schubert D. 2002.** Transgen-Silencing in *A. thaliana* und *N. tabacum*: Ursachen und Mechanismen. Dissertation an der Universität zu Köln
- Selker E.U. 1999.** Gene silencing: repeats that count. *Cell* 97: 157-60
- Seymour G.B., Fray R.G., Hill P. und Tucker G.A. 1993.** Down-regulation of two non-homologous endogenous tomato genes with a single chimaeric sense gene construct. *Plant Mol Biol* 23: 1-9
- Siemering K.R., Golbik R., Sever R. und Haselhoff J. 1996.** Mutations that suppress the thermostability of green fluorescent protein. *Curr Biol* 6: 1653-63
- Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K.L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R.H. und Fire A. 2001.** On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-76
- Smardon A., Spoerke J.M., Stacey S.C., Klein M.E., Mackin N. und Maine E.M. 2000.** EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 10: 169-78
- Southern E.M. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17
- Stahelin C., Charon C., Boller T., Crespi M. und Kondorosi A. 2001** *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene *enod40* exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15366-71
- Stam M., de Bruin R., Kenter S., van der Hoorn R.A.L., van Blokland R., Mol J.N.M. und Kooter J.N.M. 1997.** Posttranscriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J* 12: 63-82
- Stam M., de Bruin R., van Blokland R., van der Hoorn R.A., Mol J.N. und Kooter J.M. 2000.** Distinct features of post-transcriptional gene silencing by antisense transgenes in single copy and inverted T-DNA repeat loci. *Plant J* 21: 27-42

- Tanzer M.W., Thompson W.F., Law M.D., Wernsman E.A. und Uknes S. 1997.** Characterisation of posttranscriptionally suppressed transgene expression that confers resistance to tobacco etch virus infection in tobacco. *Plant Cell* 9: 1411-23
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000.** Sequence and analysis of the flowering plant *A. thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Thomas C.L., Jones L., Baulcombe D.C. und Maule A.J. 2001.** Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J* 25: 417-25
- Thierry D. und Vaucheret H. 1996.** Sequence homology requirements for transcriptional silencing of CaMV 35S-transgenes and post-transcriptional silencing of nitrite reductase (trans)genes by the tobacco 271 locus. *Plant Mol Biol* 32: 1075-83
- Tinland B. 1996.** The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science* 1: 178-184
- Todd J.J und Vodkin L.O. 1996.** Duplications that suppress and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family. *Plant Cell* 8: 687-99
- Topping J.F., Agyeman F., Henricot B. und Lindsey K. 1994.** Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant* . 5: 895-903.
- Ueki S. und Citovsky V. 2001.** RNA commutes to work: regulation of plant gene expression by systemically transported RNA molecules. *BioEssays* 23: 1087-90
- Vaistij F.E., Jones L. und Baulcombe D.C. 2002.** Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14: 857-67
- Valvekens D., van Montagu M. und van Lijsebettens. M. 1988.** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis* root explants using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5536-40
- Van Blokland R., van der Geest N., Mol J.N.M. und Kooter J.M. 1994.** Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* 6: 861-77
- Van der Krol A. R., Lenting P.E., Veenstra L., van der Meer I., Koes R.E., Gerats A.G.M., Mol J.N.M. und Stuitje A.R. 1988.** An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333: 866-68
- Van der Krol A.R., Mur L.A., de Lange P., Gerats A.G.M., Mol J.N.M. und Stuitje R. 1990a.** Antisense chalcone synthase genes in *petunia*: Visualization of variable transgene expression. *Mol Gen Genet* 220: 204-212
- Van der Krol A.R., Mur L.A., de Lange P., Mol J.N.M. und Stuitje A.R. 1990b.** Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol Biol* 14: 457-66

- Van Eldik G.J., Litiere K., Jacobs J.J., Van Montagu M. und Cornelissen M. 1998.** Silencing of beta-1,3-glucanase genes in tobacco correlates with an increased abundance of RNA degradation intermediates. *Nucleic Acids Res* 26: 5176-81
- Van Houdt H., Ingelbrecht I., Van Montagu M. und Depicker A. 1997.** Post-transcriptional silencing of a neomycin phosphotransferase II transgene correlates with the accumulation of unproductive RNAs and with increased cytosine methylation of 3' flanking regions. *Plant J* 12: 379-392
- Van Leeuwen W., Ruttnik T., Borst-Vrenssen W.M., van der Plas L.H.W. und van der Krol R. 2001.** Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants. *J Exp Bot* 52: 949-59
- Vaucheret H., Elmayan T., Mourrain P. und Palauqui J.C. 1996.** Analysis of a tobacco transgene locus that triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing. In: Russo V.E., Martienssen R.A. und Riggs A.D. (Eds.) *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, pp 403-414
- Vaucheret H., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Mourrain P., Palauqui J.C. und Vernhettes S. 1998.** Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16: 651-59
- Vaucheret H. und Fagard M. 2001.** Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* 17: 29-35
- Velten J., Velten L., Hain R. und Schell J. 1984.** Isolation of a dual promoter fragment from Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 8: 343-50
- Voinnet O. und Baulcombe D.C. 1997.** Systemic signalling in gene silencing. *Nature* 389: 553
- Voinnet O., Vain P., Angell S. und Baulcombe D.C. 1998.** Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95: 177-87
- Voinnet O., Lederer C. und Baulcombe D.C. 2000.** A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-67
- Wang M.B., Wesley S.V., Finnegan E.J., Smith N.E. und Waterhouse P.M. 2001.** Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA* 7: 16-28
- Warren G.J. 1998.** Cold stress: manipulating freezing tolerance in plants. *Curr Biol* 8: R514-6
- Waterhouse P.M., Graham M.W. und Wang M.B. 1998.** Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13959-64
- Waterhouse P.M., Wang M. und Lough T. 2001.** Gene silencing antisense an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834-42
- Welch R.M. 2002.** Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally *J Nutr Mar* 132: 495S-499S

- Williamson J.D., Hirsch-Wyncott M.E., Larkins B. und Gelvin S.B. 1989** Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S-promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 90: 1570-76
- Wu-Scharf D., Jeong B., Zhang C. und Cerutti H. 2000.** Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290: 1159-62
- Ye F. und Signer E.R. 1996.** RIGS (repeat-induced gene silencing) in Arabidopsis is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10881-6
- Ye X., Al-Babili S., Klott A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. und Potrykus I. 2000.** Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-5
- Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A. und Bartel D.P. 2000** RNAi: double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33
- Zamore P.D. 2001.** RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Struct. Biol.* 8: 746-50

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation in keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Priv.-Doz. Dr. Renate Schmidt betreut worden.

Golm, den 18.9.2002



Berthold Lechtenberg

Publikationen:

Lechtenberg B., Schubert D., Forsbach A., Gils M. und Schmidt R. 2002. Neither inverted repeat T-DNA configurations nor arrangements of tandemly-repeated transgenes are sufficient to trigger gene silencing. Eingereicht zur Veröffentlichung.

Forsbach A., Schubert D., Lechtenberg B., Gils M. und Schmidt R. 2002. A comprehensive characterisation of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. Im Druck.

Lebenslauf

Name, Vorname	Lechtenberg, Berthold
Adresse	AG Schmidt, Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, 14424 Potsdam
Geburtsdatum	17.08.67
Geburtsort	Coesfeld/Westfalen
Eltern	Margret Lechtenberg, geb. Tekstra Anton Lechtenberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Ausbildung/ Studium	
1974 - 1978	Laurentius-Schule, Kath. Grundschule in Coesfeld
1978 - 1984	Freiherr-vom-Stein Schule, Städt. Realschule in Coesfeld
1984 - 1987	Berufsausbildung zum Vermessungstechniker beim Landschaftsverband Westfalen-Lippe, Landesstrassenbauamt in Coesfeld
1987 - 1988	Zivildienst in den Werkstätten für Behinderte von Haus Hall, Zweigstelle Marienburg in Coesfeld
1989 - 1990	Fachoberschulreife, Liebfrauenschule in Coesfeld
1991 - 1992	Allgemeine Hochschulreife am Weser-Kolleg in Minden
1993 - 1999	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
April 1996	Diplomvorprüfung
Juli 1998	mündliche Diplomhauptprüfung
1998 - 1999	Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft (Köln) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. R. Schmidt mit dem Thema: "Studien zur Variabilität der Expression von Transgenen in <i>Arabidopsis thaliana</i> "
1999 - 2002	Dissertation am Max-Delbrück-Laboratorium in der Max-Planck-Gesellschaft (Köln) und am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie (Golm) bei PD Dr. R. Schmidt, mit dem Ziel der Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Dank

An Frau PD Dr. Renate Schmidt für die Betreuung meiner Arbeit, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, für sehr viele hilfreiche Diskussionen, hervorragende Unterstützung und ein sehr spannendes Projekt.

An Herrn Prof. Dr. Hülkamp für die bereitwillige Übernahme des zweiten Referenten.

An Herrn Prof. Dr. Roth für die bereitwillige Übernahme des Vorsitzes in meiner Prüfung.

An Herrn Dr. Ulrich Hildebrandt für die bereitwillige Übernahme des Beisitzes.

An Herrn Prof. Dr. Lothar Willmitzer und Herrn Prof. Dr. Mark Stitt für die Möglichkeit, meine Promotion im MPI für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm beenden zu können.

Ganz besonders Daniel „Blotgott“ Schubert, dem hiermit eine glänzende wissenschaftliche Karriere prophezeit sei. Fußballverstand ist eine andere Sache.

An Sandra Stegemann für sehr viel Hilfe im Labor und im Gewächshaus.

An Oliver Clarenz für die Sorge um unsere Pflanzen.

An meine ehemaligen Kollegen Mario Gils, Alexandra Forsbach, Adile Acarkan, Mathias Rossberg, Karine Boivin und Rosa Stella Mbulu, sowie an die Praktikanten Christoph Paschke und Carolin Schmitz.

An die Gärtner-Teams in Köln und Golm, besonders Torsten Schulze, Linda Bartzko, Britta Hausmann und Frank Eikermann.

An die Computergruppe in Golm.

An meine Eltern, sie haben mich nie zur Musikschule gezwungen und sind auch sonst für das Zustandekommen dieser Arbeit verantwortlich.

An Marion - ohne Worte.